CHARAKTERISIERUNG DES WIRKUNGSMECHANISMUS VON HEMMSTOFFEN DER Na^+-, K^+-AKTIVIERBAREN, Mg^{2+}-ABHÄNGIGEN ADENOSIN-TRIPHOSPHATASE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt
von Alanna Ann Louise Fox
aus Maidenhead, England

Düsseldorf 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung:

A.	Na^+,K^+-aktivierbare, Mg^{2+}-abhängige ATPase, physiologische und pharmakologische Bedeutung.	1
	Hypothetischer Reaktionsablauf der Na^+,K^+-aktivierbaren ATPase.	7

Methodik:

B.1.	Reagenzien	12
B.2.	Statistische Methoden.	14
B.3.	Proteinbestimmung.	14
B.4.	Isolierung des Enzyms aus verschiedenen Geweben.	16
B.5.	Aktivitätsbestimmung durch Messung des anorganischen Phosphates.	19
B.6.	Aktivitätsbestimmung durch gekoppelte Ein-Substrat-Reaktion.	19
B.7.	Bestimmung der Na^+,K^+-ATPase Aktivität in Anwesenheit von Hemmstoffen	
B.8.	^{14}C-ATP-Bindung an die Na^+,K^+-aktivierbare ATPase	23
B.9.	Na^+-Ionenabhängige-^{32}P-ATP-Phosphorylierung.	24
B.10.	Spontane, K^+-und ADP-abhängige-Dephosphorylierung.	26
B.11.	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten.	26
B.12.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten.	26

Ergebnisse:

C.1.	Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA im Vergleich mit anderen Hemmstoffen.	28
C.2.	Einfluß von Na^+ , K^+ , Mg^+ und ATP auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA.	34
C.3.	Einfluß der Temperatur auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA.	44
C.4.	Reversibilität der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA.	46
C.5.	Einfluß der Präinkubation auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA.	49
C.6.	Lipidlöslichkeit, Ionisationsgrad und Wirksamkeit von BIIA.	50
C.7.	Einfluß von BIIA auf die Substratbindung.	55
C.8.	Einfluß von BIIA auf die Na^+-abhängige Phosphorylierung.	59
C.9.	Einfluß von BIIA auf die spontane K^+- und ADP-abhängige Dephosphorylierung.	71

Diskussion. 74

Zusammenfassung. 86

Literaturverzeichnis. 89

Dank an den Referenten 99

Lebenslauf 100

Einleitung

Na^+, K^+-aktivierbare, Mg^{2+}-abhängige ATPase, physiologische und pharmakologische Bedeutung.

Die Plasmamembran ist eine zelluläre Permeabilitätsbarriere. Sie besteht zu ca. 90 % aus etwa gleicher Menge an Lipiden und Proteinen und zu ca. 10 % aus Kohlenhydraten, die vorwiegend als Bestandteil von Lipid- und Proteinverbindungen auftreten (BRETSCHER, 1973). Die Lipidzusammensetzung der Zellmembran ist sehr unterschiedlich, da sie vom Zelltyp abhängig ist. 400 verschiedene Phospholipidspezies sind in der Natur zu finden (Op den KAMP, 1977).

Eine wichtige Eigenschaft der Zellmembran ist ihre selektive Permeabilität (LEHNINGER, 1976). Sie enthält Enzyme, die in engem Zusammenhang mit aktiven Transportsystemen für Na^+,K^+, Glucose, Aminosäuren und eine Reihe von Nährstoffen stehen. Offensichtlich bestehen enge Beziehungen zwischen der Zusammensetzung der Phospholipide und den Ionentransporteigenschaften der Biomembranen (DEUTICKE, 1972; McMURRAY et al., 1972; JACKSON u. GOTTO, 1974).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Na^+,K^+-aktivierbaren, Mg^{2+}-abhängigen ATPase (ATPphosphohydrolase, EC 3.6.1.3), die ein ATP-spaltendes Enzym darstellt und Bestandteil der Zellmembran ist. Die Existenz eines solchen Enzyms in mikrosomalen Fraktionen von Krebsnerven (Carcinus maenas) ist zuerst von SKOU, 1957, festgestellt worden. Dieses Enzym ließ sich durch

die Kationen Na^+ und K^+ aktivieren und war von der Mg^{2+}-Konzentration abhängig. Zwei Aktivierungsstellen sind deswegen vorgeschlagen worden, eine mit einer hohen Affinität für Na^+ und eine für K^+. Weil dieses Enzym eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung der Ionengradienten an der Zellmembran spielt, ist es weit verbreitet. Die Eigenschaften der Na^+,K^+-aktivierbaren ATPase des Herzgewebes unterscheiden sich nicht sehr stark von den Eigenschaften der ATPase in Nierentubuli, Erythrozyten und Riesenaxon (GLYNN, 1968; SKOU, 1973). Unter Ruhebedingungen sind sich die Zellen von Herzmuskel, Skelettmuskel und glatten Muskeln darin ähnlich, daß eine Potentialdifferenz zwischen Membraninnen und -außenseite besteht (NAYLER, 1970). Diese ist auf eine hohe intrazelluläre K^+-Ionenkonzentration ($[K^+]_i$) zurückzuführen (DRAPER und WEIDMANN, 1951). Die Natriumkonzentration ist intrazellulär geringer als extrazellulär, wobei der Quotient $(Na^+)_o : (Na^+)_i$ ungefähr 5 : 1 ist.

Für die Aufrechterhaltung der Konzentrationsgradienten und der Potentialdifferenz ist eine beträchtliche Energie erforderlich; Na^+-Ionen müssen aus dem intrazellulären Milieu entgegen einem elektrochemischen Gradienten transportiert werden. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, daß die Energie für diesen Prozeß zumindest zum Teil durch die Aktivität der Na^+,K^+-aktivierbaren ATPase bereitgestellt wird (SKOU, 1965). Dieses Enzym weist an der Zellmembran eine Asymmetrie in Bezug auf seine

Na^+- und K^+-Aktivierbarkeit auf (GLYNN, 1962; WHITTAM, 1962), denn K^+ stimuliert extrazellulär Na^+ intrazellulär die Enzymaktivität. K^+-Interaktionen mit Na^+-Aktivierungsstellen oder Na^+-Interaktionen mit K^+-Aktivierungsstellen vermindern oder verhindern den Transport (CHAPLAIN, 1973). Verschiedene einwertige Ionen, z.B. Li^+, Rb^+, Cs^+, Tl^+ und NH_4^+, mit Ausnahme von Natrium stellen einen teilweise wirksamen Ersatz für K^+-Ionen an den K^+-Bindungsstellen dar, aber kein einwertiges Kation kann Na^+ ersetzen (SKOU, 1965; GLYNN u. KARLISH, 1975).

Die Stöchiometrie des intakten Enzymsystems ist in Erythrozyten nachgewiesen worden (SEN und POST, 1964; WHITTAM und AGER, 1965). Das Enzym benutzt die Energie, die durch die Spaltung von ein Mol ATP zu ADP freigesetzt wird, um 3 Mol Na^+ aus der Zelle heraus und 2 Mol K^+ in der Gegenrichtung zu transportieren.

Das gereinigte Enzym besteht aus zwei Polypeptidketten, eine mit einer Masse von 90.000 Dalton (α -Kette) und die andere 40.000 Dalton (ß-Kette) (JØRGENSEN, 1974). Die α- und ß-Ketten sind wahrscheinlich in einem Molverhältnis von 1 zu 1 vorhanden, obwohl über diesen Punkt Ungewißheit besteht. Querbrückenstudien stimmen mit der Ansicht überein, daß ein enger Kontakt zwischen α- und ß-Kette besteht (α,ß-Subeinheit).

KYTE (1975) kam zu der Schlußfolgerung, daß $\alpha_2\beta_2$ die Struktur des aktiven Enzyms ist, dessen Proteinmolekulargewicht 260.000 beträgt. Selbst die maximal gereinigten Präparationen scheinen Membranfragmente zu sein, in denen die Lipid- und Proteinkomponenten ihre ursprüngliche Orientierung zueinander beibehalten (JORGENSEN, 1974). Die ATPase-Molekül der Zellmembran ist anscheinend bezüglich seiner funktionellen Vollständigkeit von den Phospholipiden abhängig (ROELOFSEN und Van DEENEN, 1973). Durch Extraktion der Membran-ATPase mit Desoxycholat oder Lubrol W (WHEELER et al., 1975) gehen Phospholipide, Cholesterin und Enzymaktivität gleichzeitig verloren. Reaktivierung des lubrol-extrahierten Enzyms ist nach Zugabe von Phospolipidsuspensionen beobachtet worden. Eine Gruppe Phospholipide soll das lipidarme Enzym reaktivieren (PALATINI et al., 1977). Dies sind Diacyl-Phospholipide mit Acylketten und negativ geladenen polaren Köpfen, die in der Lage sind, sich in einer lamellenartigen Konfiguration anzubieten.

Die Na^+,K^+-aktivierbare ATPase ist für die pharmakologische Forschung von besonderer Bedeutung, da sie durch niedrige Konzentrationen herzwirksamer Glykoside gehemmt wird und daher spezifische Rezeptoren für diese Substanzen besitzt (GREEFF, 1963; AKERA, 1971). Nicht nur Digitalis-Glykoside, sondern eine große Zahl anderer Substanzen hemmen das Enzym (Literaturübersicht bei SCHWARTZ et al., 1975). Da eine Interaktion zwischen diesen Substanzen und der Na^+,K^+-aktivierbaren ATPase

Ursache von pharmakologischen und physiologischen Wirkungen sein kann, spielt dieses Enzym eine wichtige Rolle in der Rezeptor-Pharmakologie (Literaturübersicht bei CUATRECASAS, 1974). Die enzymhemmenden Substanzen lassen sich in unterschiedliche Gruppen einteilen, deren Ähnlichkeit darin besteht, daß die Hemmung durch besondere Liganden möglich ist und der Reaktionsablauf an bestimmten Stellen festzustellen ist (SCHWARTZ et al., 1975). Hieraus kann man die Schlußfolgerung ziehen, daß die Na^+,K^+-aktivierbare ATPase ein komplexes Molekül ist, das mehrere Bindungsstellen besitzt.

Präparationen einer partiellen gereinigten Na^+K^+-aktivierbaren ATPase, wie sie z.B. von SCHONER (1967) hergestellt wurden, haben sich als nützliche Modelle für das Studium der Rezeptor-Markierung erwiesen. Ob die Hemmung der Na^+,K^+-aktivierbaren ATPase für die positiv inotropen Effekte der Herzglykoside verantwortlich ist, bleibt umstritten (GREEFF et al., 1974; OKITA, 1977; LANGER, 1977). Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, daß die Herzglykosidbindung, z.B. von (H^3)-Ouabain, an Na^+,K^+-aktivierbare ATPase von Mikrosomen mit der Hemmung der Aktivität dieses Enzyms korreliert (GELBART und GOLDMANN, 1977; ERDMANN et al., 1971). Dies ist unabhängig davon, ob die Hemmung der ATPase die therapeutisch benutzte positiv inotrope Wirkung verursacht. Demgegenüber lassen sich die bei höheren Dosen beobachteten toxischen Symptome auf die Enzymhemmung zurückführen (ZAVECZ und DUTTA, 1977).

Der Einsatz hemmender Substanzen trägt bekanntlich dazu bei, den Wirkungsmechanismus von Enzymen aufzuklären. Dies gilt auch für die Na^+,K^+-aktivierbare ATPase mit ihrem komplexen Reaktionsmechanismus und insbesondere für die Charakterisierung der kationenaktiven Stellen (DAHL und HOKIN, 1974), über die das Enzym aktiviert wird und über die es widersprechende Ansichten gibt (ROBINSON, 1974). Für die Klärung dieser Fragen wäre eine Substanz wünschenswert, deren ATPase-Hemmung durch ein Kation beeinflußt wurde. CANESSA et al. (1973) haben angeblich mit Harmala Alkaloiden solche Verbindungen entdeckt, die eine Hemmung der Na^+,K^+-aktivierbaren ATPase bewirken, jedoch nur kompetitiv gegenüber Na^+. Dieser Befund ist von ROBINSON (1975) infrage gestellt worden. Im Hinblick auf diese unklare Situation war unsere Feststellung von besonderem Interesse, daß BIIA, eine von SZEKERES et al. (1974) als Antiarrythmikum beschriebene Substanz, 3-Benzylamino-5,6-dihydro-8,9-dimethoxy-imidazo-[5,1-a]-isochinolin-hydrochlorid eine Hemmung der Na^+,K^+-aktivierbaren ATPase bewirkt, deren Mechanismus sich von dem der Digitalis-Glykoside unterscheidet. Für Formel siehe Abb. 1.

Hypothetischer Reaktionsablauf der Na^+,K^+-ATPase

(nach DAHL und HOKIN 1974).

$$E_1 + ATP \rightleftharpoons^{Mg^{++},Na^+} E_1 - P + ADP \quad (1)$$

$$E_1 - P \rightleftharpoons^{Mg^{++}} E_2 - P \quad (2a)$$

oder $$E_1 - P + ADP \uparrow \rightleftharpoons^{Mg^{++}} E_1 + ATP \quad (2b)$$

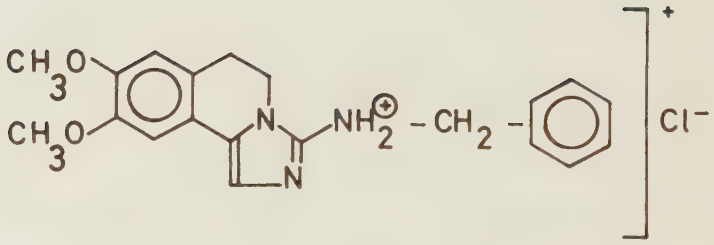
$$E_2 - P + K' \rightleftharpoons K - E_2P \quad (3)$$

$$K\text{-}E_2\text{-}P + H_2O \rightleftharpoons KE_2 + P \quad (4)$$

$$K - E_2 \rightleftharpoons E_2 + K^+ \quad (5)$$

$$E_2 \rightleftharpoons^{Na^+} E_1 \quad (6)$$

BIIA



3-Benzylamino-5,6-dihydro-8,9-dimethoxy-imidazo-[5,1-a]-isochinolin-hydrochlorid

Mol.-Gew. 371,5

Abb. 1

Experimentelle Befunde begründen die Theorie, daß der Reaktionsmechanismus der Na^+, K^+-aktivierbaren ATPase aus einer Serie partieller Reaktionen besteht. Diese Zwischenprodukte sind durch ihre Interaktion mit besonderen Liganden und die aus ihnen entstehenden Produkte gekennzeichnet.

Es ist festgestellt worden, daß Membranpräparationen ^{32}P aus (γ ^{32}P) ATP in Anwesenheit von Mg^{++}-Ionen und proportional zur Na^+-Ionenkonzentration und der Enzymaktivität inkorporieren (Übersichtsarbeit bei SCHWARTZ, 1975). Die Reihenfolge der Bindungsstärke von Substraten und Ionen ist noch umstritten (CANESSA et al., 1973); aber kein Ion kann Na^+ bei Na^+-abhängigen Phosphorylationsschritten (1) ersetzen (POST, 1965).

Nach Trichloressigsäurebehandlung bleibt ^{32}P an das Fällungsprotein gebunden. BADER (1970) nahm an, daß die Bindung von ^{32}P an das Enzym eine acylcovalente Bindung ist. Wenn K^+ und Na^+ während Phosphorylation gleichzeitig anwesend sind, so wurde weniger Radioaktivität in dem säurelöslichen Fällungsprotein gefunden (SKOU und HILBERG, 1969).

Zugabe von K^+ und kaltem ATP bewirkt eine fünffache Beschleunigung der Spaltung des Phosphoproteinkomplexes. Dies weist darauf hin, daß K^+ die Hydrolyse des Acylphosphat-Komplexes stimulierten d.h. Gleichungen (3)-(5) können vereinfacht geschrieben werden:

$$E_2 - P + H_2O \xrightleftharpoons{K^+} K_2 + P.$$

Einwertige Kationen, die als Ersatz für K^+ die ATPase aktivieren, können auch die Acylphosphatspaltung stimulieren (POST, 1965). Dieser isolierte Schritt im Reaktionsmechanismus der Na^+,K^+-aktivierbaren ATPase wird K^+-abhängige Dephosphorylisierung und das Enzym K^+-abhängige Phosphatase genannt. Sie wird

durch Ouabain gehemmt (Übersichtsartikel bei DAHL und HOKIN, 1974). P-Nitrophenylphosphat, Acetylphosphat, Umbelliferonphosphat und Carbamylphosphat werden ebenfalls als Substrat für die Phosphatase benutzt.

Die starke Abhängigkeit der K^+-abhängigen Phosphatase von der Aktivität der Na^+,K^+-ATPase (parallele Anreicherung während Präparation, JORGENSEN, 1971), weist darauf hin, daß die Phosphatasereaktion ein Schritt des Enzymzyklus ist. Digitalisglykoside sollen an der Na^+,K^+-ATPase durch Beeinflussung dieses Schrittes u.a. eine Hemmung bewirken (FUJITA et al., 1966). K^+ kann diese Hemmung bei niedrigen Glykosidkonzentrationen komplett aufheben, aber bei höheren Glykosidkonzentrationen scheint die Interaktion zwischen Glykosiden und K^+ zum Teil auch nicht kompetitiv zu sein (Dunham und Glynn, 1961; Schatzmann, 1965). Erniedrigung von Plasma K^+ führt zu einer erhöhten Toxicität der Digitalisglykoside (ERDMANN et al., 1977; BLUSCHKE et al., 1976).

Die Existenz verschiedener Varianten des Phosphoproteins ist zuerst 1960 von Skou entdeckt worden, als er eine Mg^{++}-abhängige Aktivität für den Aufbau von ATP aus ADP in Mikrosomenpräparationen von Krebsnerven nachwies, jedoch unter nicht optimalen Bedingungen für die Enzymaktivität. Ein Teil dieser Aktivität war nach Differentialzentrifugation an Mikrosomen fest gebunden (STAHL, 1966). Der Aufbau von ATP aus ADP findet unter besonderen Bedingungen statt: Bei niedriger Mg^{2+}-Konzentration in Anwesenheit von Na^+-Ionen und N-Äthylmaleimid (N.E.M.) (FAHN et al., 1964, 1966, 1968). N.E.M. soll die K^+-abhängige Phosphatasereaktion hemmen; dies weist auf die Existenz von zwei Phosphoproteinformen der ATPase hin, denn eine Form ist ADP-empfindlich (Reaktion 2 b) und existiert bei niedrigen Mg^{++}-Konzentrationen (E_1-P), während die andere K^+-empfindlich ist und von (E_1-P) bei höheren Mg^{2+}-Konzentrationen gebildet wird (Reaktion 2 a). Diese Umwandlung soll durch N.E.M. und Oligomycin gehemmt werden.

Nach der K^+-abhängigen Dephosphorylierung werden K^+ Ionen intrazellulär freigesetzt und das Enzym ist wieder fähig, Na^+- und ATP zu binden, so daß der Zyklus erneut ablaufen kann.

Nachdem wir feststellten, daß eine von SZEKERES et al. (1974) beschriebene antiarrhythmisch-wirkende Substanz, Benzylamino-5,6-dihydro-8,9-dimethoxyimidazo-(5,1-a)-isochinolin-HCL, (BIIA) die Na^+,K^+-aktivierbare ATPase spezifisch hemmt, sollte der Wirkungsmechanismus dieser Hemmung im Vergleich zu Herzglykosiden und anderen Hemmstoffen untersucht werden, um weitere Anhaltspunkte für den Reaktionsablauf der ATPase und seine Beeinflußbarkeit durch Inhibitoren zu erhalten.

B.1. Reagenzien

Adenosin-5'-diphosphat, Dinatriumsalz von Boehringer Mannheim GmbH.

Adenosin-5'-triphosphat, krist. Dinatriumsalz von Boehringer Mannheim GmbH.

[8-^{14}C] -Adenosin-5'-triphosphat, Tetranatriumsalz 40-60 mCi/mMol von NEN Chemicals, Dreieichenhain

[γ -^{32}P] -Adenosin-5'-triphosphat, Tetra (triäthylammonium) salz 10 mCi/mMol, NEN Chemicals, Dreieichenhain

Äthanol absolut zur Analyse von Merck, Darmstadt

Äthylendinitrilotetraessigsäure, EDTA, Titriplex II von Merck, Darmstadt

Äthylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz (dihydrat), EDTA Na_2, Titriplex III von Merck, Darmstadt

N-Äthylmaleinimid, NEM, von Fluka AG., Buchs SG., (Schweiz)

3-Benzylamini-5,6-dihydro-8,9-dimethoxy-imidazo-(5,1-a)-isochinolin-hydrochlorid, BIIA, von Firma Dr. Thiemann, Lünen/Westfalen

Cyclohexylen-(1,2)-dinitrilotetraessigsäure (monohydrat) CDTA, Titriplex IV von Merck, Darmstadt

L-Cystein von Merck, Darmstadt

Digitoxin von Merck, Darmstadt

Digoxin von Merck, Darmstadt

Dihydro-digitoxin von Boehringer, Mannheim GmbH.

Dihydro-digoxin von Boehringer, Mannheim GmbH.

Dihydro-ouabain von Boehringer, Mannheim GmbH.

Folin-Ciocalteus Phenolreagenz von Merck, Darmstadt

L-Histidin von Merck, Darmstadt

Kaliumjodid, Suprapur^{R} von Merck Darmstadt

Lithiumbromid, Suprapur^{R} von Merck, Darmstadt

2-Mercaptoäthanol von Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei München

Natriumdesoxycholat, von Merck, Darmstadt
Natriumjodid zur Analyse von Merck, Darmstadt
ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert, Dinatrium-salz, NADH von Boehringer Mannheim GmbH.
Octanol -(1) von Merck, Darmstadt
Oligomycin von Sigma Chemie gmbH., München
Ouabain von Merck, Darmstadt
Phosphoenolpyruvat, Tricyclohexylammoniumsalz, PEP von Boehringer Mannheim GmbH.
Polidocanol, Thesit^{R} -Substanz, von Desitin-Werk Carl Klinke GmbH., Hamburg
Pyridin zur Analyse von Merck, Darmstadt
Pyruvat-Kinase/Lactat-Dehyrogenase aus Kaninchenmuskel von Boehringer Mannheim GmbH.
Rinderalbumin, Lyophilisat von Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Saccharose von Merck, Darmstadt
Unisolve 1 von Werner Zinsser, Frankfurt

B.2. Statistische Methoden

Die Substratkonzentration erforderlich für eine 50%ige Hemmung der Na^+,K^+-ATPase (ID_{50}) wurde durch eine Logittransformation mit einer Kurvenanpassung mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate, ermittelt (HAFNER et al., 1977).

Ergebnisse wurden als Mittelwert ± Fehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) oder Mittelwert ± Standard-Abweichung ($\bar{x} \pm s_x$) ausgedrückt.

Regressionen und Korrelationskoeffizienten wurden mit einem Texas Instrument SR-51-II berechnet.

B.3. Proteinbestimmung

Enzymprotein-Konzentrationen wurden nach einer modifizierten Folin-Methode vorgenommen (Lowry et al., 1951).
Je nach Gehalt an Protein wurden die zu bestimmenden Enzymproben entweder 1:10 oder 1:5 bis zu einer Endkonzentration von 100 bis 250 µg Protein/ml verdünnt. Zu Beginn wurde eine Standardproteinlösung von 100 µg Rinderalbumin in 1 ml Aq. bidest. angesetzt. Aus den folgenden Stammlösungen wurde jeden Tag eine Lösung A frisch angesetzt:

a) 2 % (g/V) Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH .... 50 ml
b) 1 % (g/V) Natriumtartrat ..... 1 ml Lösung A
c) 0,5 % (g/V) $CuSO_4$ x 5 H_2O ..... 1 ml

Folin-Ciocalteus Phenolreagenz wurde 1:3 mit Aq.bidest. verdünnt und der folgende Ansatz hergestellt:

Probenröhrchen	1	2	3	4	5	6	7	
Protein 0,1 mg/ml	-	0,1	0,15	0,2	0,25	-	-	ml
Medium	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	ml
Enzym verd. 1:10 bzw. 1:5	-	-	-	-	-	0,1	0,1	ml
dest. Wasser	0,25	0,15	0,1	0,05	-	0,25	0,25	ml
Lsg. A	1,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	ml
Nach dem Schütteln 5 Minuten bei 37° C inkubiert								
Folin-Ciocalten	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	ml

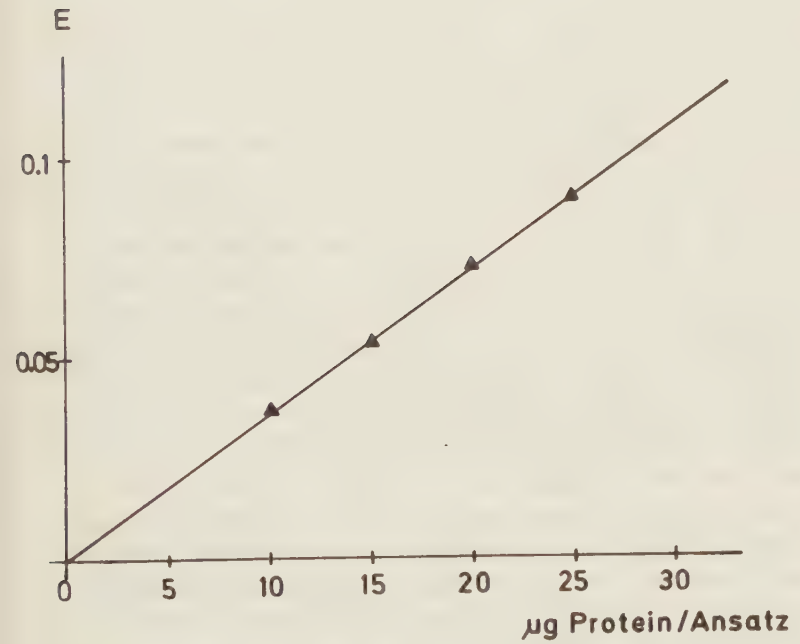


Abb. 2 Eichkurve für die Protein-Bestimmung.

Die Proben wurden 20 Minuten bei 37° C inkubiert und die Extinktion bei 578 nm bestimmt.
Abb. 2 zeigt eine Eichkurve.
Die Vorteile dieser Methode bestanden einmal darin, daß durch die Verdünnung der Proben die störenden Effekte von suspendierten Lipiden fast eliminiert wurden und zweitens, daß durch die Zugabe des enzymfreien-Homogenisationsmediums zur Eichlösung der Einfluß dieses Mediums reduziert wurde.

B.4. Isolierung des Enzyms aus verschiedenen Geweben

ATPase aus Meerschweinchenherz wurde in Anlehnung an die Methode von AKERA et al. (1969) hergestellt.
10 - 12 Meerschweinchenherzen wurden gesammelt, entweder frisch präpariert oder bis zu 2 Wochen eingefroren und wieder aufgetaut. Die Herzen wurden im Kühlraum bei 4° C von Fett und Bindegewebe freipräpariert und mit der Schere zerkleinert. Dann wurden pro 1 g Herzmuskel 4 ml einer Lösung zugesetzt, die 0,25 M Saccharose, 5 mM Histidin, 5 mM Na_2-EDTA und 0,15% Na-Desoxycholat enthielten (pH 6,8). Die anschließende Homogenisierung erfolgte 20 s lang in einem Messerhomogenisator (Ultra-Turrax). Danach wurde das Homogenat 30 min lang bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde 60 min bei 100.000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde resuspendiert und wieder bei 100.000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 10 ml Lösung (0,25 M Saccharose, 5 mM Histidin und 1 mM Tris-EDTA, pH 7,0) suspendiert, zu einer gleichen Menge 2 M LiBr-Lsg. gegeben und eine Stunde lang bei 4° C gerührt. Diese Mischung wurde zweimal je eine Stunde bei 100.000 g zentrifugiert, und vor der zweiten Zentrifugation in Saccharose-Histidin-EDTA-Medium resuspendiert. Der entstandene Niederschlag wurde in 1 ml Lösung pro 1 g Herz (Feuchtgewicht) homogenisiert, unter langsamen Rühren etwa 18 Std. dialysiert und bei -20° C aufbewahrt.

Meerschweinchen-Nieren-Mikrosomen wurden nach einer von SKOU (1962) angegebenen Methode hergestellt. Meerschweinchennieren wurden frisch, oder bis zu 2 Wochen eingefroren, wieder aufgetaut und präpariert. Nach Ablösung von Fett und Bindegewebe wurden die Nieren mit einer Schere zerkleinert. Dann wurde das Gewebe in 10 ml einer Na-Desoxycholat-Lsg. pro 1 g Feuchtgewicht 20 s mit einem Ultraturax homogenisiert. Die Na-Desoxycholatlösung enthielt 0,25 M Saccharose, 5 mM Na_2-EDTA, 30 mM Histidin, 0,1 % Na-Desoxycholat (pH 6,8). Das Homogenat wurde 10 min bei 2400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine vierfache Gazeschicht filtriert und 10 min bei 8000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut durch Gaze gesaugt und 90 min bei 40.000 g zentrifugiert. Zur Senkung der Mg^{++}-ATPase-Aktivität und Anreicherung der Na^+,K^+-ATPase-Aktivität wurde eine Methodik von NAKAO et al. (1965) und von CANESSA et al. (1973) in modifizierter Form benutzt. Der letzte Niederschlag wurde 30 min bei 4° C in 10 ml einer 2 M KJ- oder NaJ-Lsg. pro 4 g Niere (Feuchtgewicht) gerührt, die 3,3 mM $MgCl_2$, 2,5 mM Tris-EDTA, 2,5 mM Cystein und 1,3 mM Tris-ATP enthielt (pH 0,8). Die Mischung wurde mit Aq. bidest. auf 0,8 M KJ oder NaJ verdünnt und 30 min bei 100.000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 5 mM Tris-EDTA-Lsg., pH 7,4, suspendiert und nochmal zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag in 1,5 ml Lösung pro 1 g Niere homogenisiert, die 0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 3 mM Tris-Puffer pH 7,0 (SCHWARTZ & MATSUI, 1966), homogenisiert, unter langsamen Rühren etwa 18 Std. dialysiert und bei -20° C aufbewahrt.

Meerschweinchen-Hirn Na^+,K^+-ATPase wurde in Anlehnung an die Methodik von BORSCH - GALETKE (1972), aber mit anschließender KJ-Behandlung, präpariert. Zu 1 g Hirn wurden 5 ml eiskalte 0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 3 mM Tris-Lsg., pH 7,0, gegeben und diese Mischung 5 s im Ultraturrax homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 5 ml Lösung

wurde nochmals homogenisiert. Das Homogenat wurde durch einfache Gaze filtriert und 15 min bei 3.600 g zentrifugiert. Der lockere, weiße Niederschlag wurde mit KJ behandelt (siehe Präparation der Nieren-ATPase) und in 3 ml Saccharose-Lösung (wie oben), bezogen auf 1 g Hirn, homogenisiert, dialyziert und bei -20° C aufbewahrt.

Herstellung der Dialysekammer

Dialyseschläuche (Visking Größe von Klees, Düsseldorf, Flachbreite 25 mm) wurden in ungefähr 10 cm lange Stücke geschnitten. Diese Streifen wurden 1-2 Stunden in heißem Leitungswasser eingeweicht und anschließend mindestens 2-3 Stunden in Aq. bidest. aufbewahrt. Anhaftendes Wasser wurde mit Filterpapier abgetupft. Ein Ende wurde verdreht und mit einem Knoten versehen. Der Dialysebeutel wurde über eine Pipette mit dem Mund aufgeblasen und trocknen gelassen. Ein Röhrchen wurde in den Beutel gesteckt und ein Gummibändchen um das Ende geschlungen. Der Sack wurde zusammen mit dem Röhrchen in einem größeren Gefäß befestigt, das das mehrfache Volumen an Dialysat (300 ml Saccharose Lösung) enthielt. 10 bis 15 ml der zu dialysierenden Enzymsuspension wurden vorsichtig durch das Röhrchen eingefüllt, ohne das Luft beigemengt wurde. Nach Zugabe des Enzyms mußten die Flüssigkeitsspiegel innerhalb und außerhalb des Sackes etwa gleich sein.
Das Enzym wurde unter langsamem Rühren etwa 18 Std. dialysiert und bei -20° C eingefroren.

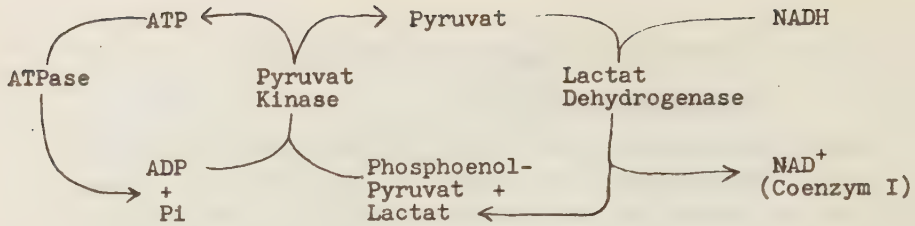
B.5. Aktivitätsbestimmung durch Messung des anorganischen Phosphates

Zur Aktivitätsmessung der Enzyme wurde die Membranfraktion langsam in Eiswasser aufgetaut und mit Aq. bidest. bis zu einer Konzentration von 2 bis 4 mg Protein/ml verdünnt. (Diese Verdünnung war von dem zu untersuchenden Gewebe und dessen ATPase-Aktivität abhängig.)

Für die Gesamtaktivitätsmessung wurden 0,1 ml Enzymsuspension in einem Mg^{++}-, Na^{+}- und K^{+}-haltigen Medium 5 Minuten bei 37° C präinkubiert. Die Reaktion wurde nach Zugabe von Na_2ATP gestartet, der Ansatz nach 10 min in Eiswasser gestellt und die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 70%ige TCA-Lösung gestoppt. Die Ansätze enthielten in einem Endvolumen von 1,3 ml: 50 mM Imidazol pH 7,0/7,4 (siehe Abschnitt B.7.), 3 mM Mg^{++}, 100 mM Na^{+}, 10 mM K^{+} und 3 mM ATP. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages, 5 min bei 1.500 g, wurden 0,5 ml des Überstandes zur Bestimmung des anorganischen Phosphats nach FISKE und SUBBAROW (1925) entnommen. Die Menge des in 10 min entstandenen anorganischen Phosphates wurde als Maß für die ATPase-Aktivität angesehen.
Zur Bestimmung der Aktivität der Mg^{++}-ATPase wurde in den enzymatischen Assays 10 min vor dem ATP-Zusatz g-Strophanthin hinzugegeben, so daß die Endkonzentration 0,25 x 10^{-3}M betrug. Die Na^{+},K^{+}-ATPase-Aktivität entsprach der Differenz zwischen Gesamtaktivität und Mg^{++}-ATPase-Aktivität.

B.6. Aktivitätsbestimmung durch gekoppelte Ein-Substrat-Reaktion

Die ATPase-Aktivität wurde auch in Anlehnung an die Methodik von PULLMANN et al. (1960) und FRITZ und HAMRICK (1966) nach folgendem Prinzip bestimmt:



Diese Methodik wurde für die Messung in einem Zeiss Spektrophotometer PM 7 mit Küvettenautomatik modifiziert. 2,5 ml Endvolumen enthielten: 3 mM ATP, 5 mM Mg^{++}, 100 mM Na^{+}, 10 mM K^{+}, 50 mM Imidazol-Cl-Puffer (pH 7,4), 0,25 mM NADH, 0,34 mM Phosphoenolpyruvat, ungefähr 5 Einheiten Pyruvat-Kinase, 4 Einheiten Lactat-Dehydrogenase und 50 µl Enzymsuspension (30 - 80 µg Protein). Die Menge an Enzym-Protein war von dem Ursprungsgewebe und dem Präparationsverfahren abhängig. Meerschweinchenherz-ATPase wurde meistens unverdünnt benutzt. Der höhere Proteingehalt und die höheren Aktivitäten der Nieren- und Hirnenzympräparationen erforderten eine 1:2 bis 1:4 Verdünnung. Das Enzym wurde mit 5 mM Mg^{++}, 100 mM Na^{+}, 10 mM K^{+} und 50 mM Imidazol-Cl-Puffer (pH 7,4) 10 min bei 37° C präinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von NADH und ATP gestartet. Die Absorptionsabnahme wurde bei 340 nm und 37° C gemessen. Die "Steady State"-Geschwindigkeit wurde bei Nieren- und Hirn-Enzym 3 min und bei Herz-Enzym 6 min nach Reaktionsanfang bestimmt. Da ein direktes molares Verhältnis zwischen oxidiertem NADH und freigesetztem Phosphat besteht, kann man die µMol oxidiertes NADH direkt in µMol freigesetztes anorganisches Phosphat umrechnen. Zur Bestimmung der Mg^{++}-ATPase Aktivität wurde das Enzym 10 min mit Ionen und 1 mM g-Strophanthin präinkubiert. Die Gesamt-Aktivität abzüglich der Mg^{++}-ATPase-Aktivität entsprach wieder der Na^{+},K^{+}-ATPase-Aktivität.

B.7. Bestimmung der Na^+,K^+-ATPase-Aktivität in Anwesenheit von Hemmstoffen

Zur Untersuchung der hemmenden Eigenschaften der Substanzen sind folgende Gesichtspunkte zu berücksichtigen:

Die verwendeten Substanzen Digoxin, Dihydrodigoxin, Digitoxin und Dihydrodigitoxin sind schlecht wasserlöslich. Die Substanzen wurden deshalb erst in Pyridin gelöst und dann entsprechend verdünnt. Die Herzglykosid-Enzym-Reaktion wurde hierdurch nicht beeinträchtigt. BIIA wurde am Anfang als Lyophilisat benutzt, und war nur bei pH <7.0 löslich. Deswegen wurden die ersten Dosiswirkungskurven bei pH 7,0 hergestellt. Später waren Reinkristalle verfügbar und die Messungen wurden bei pH 7,4 weitergeführt. Oligomycin mußte erst in Alkohol gelöst werden. Die Alkoholmenge hatte keinen Einfluß auf die ATPase. Die restlichen Substanzen waren alle gut wasserlöslich. Zur Untersuchung der Reaktionskinetik der ATPase wurde der Ionengehalt des Inkubationsmediums geändert. Zur Messung der Mg^{++}- und K^+-Abhängigkeit Na^+,K^+-ATPase der Hemmung konnte die gekoppelte Ein-Substrat-Bestimmungsmethodik nicht benutzt werden, weil Pyruvat-Kinase Mg^{++}- und K^+-abhängig ist (BOYER, 1962). Zur Änderung der Na^+-Konzentration wurde Cholinchlorid als osmotischer Ersatz benutzt. Der Einfluß der ATPase-hemmenden Substanzen auf die Pyruvat-Kinase oder die Lactat-Dehydrogenase, d.h. die Indikatorreaktion der gekoppelten Assays, mußte erst ausgeschlossen werden. 1 mM ADP wurde in Abwesenheit von Membran-ATPase an Stelle von ATP als Substrat zugemischt und die Geschwindigkeit der Extinktionsabnahme mit und ohne die Testsubstanzen gemessen.
Auch die Entwicklung und Ablesung der Phosphat-Komplexe nach FISKE und SUBBAROW mußte von den Hemmsubstanzen unbeeinflußt sein. Die Berechnung des Einflusses von Verbindungen auf die Na^+,K^+-ATPase wurde nach einer bestimmten Inkubationsdauer in einem Medium mit dem oben angeführten Ionengehalt durch-

geführt. Substanzen die selbst bei 340 nm stark absorbierten, konnten nur durch die Bestimmung der Freisetzung von anorganischem Phosphat durch die Na^+,K^+-ATPase untersucht werden. PH und Temperatur wurden ebenfalls während Präinkubation und Messung variiert. Bei Untersuchung der pH-Abhängigkeit wurden 100 mM anstatt 50 mM Imidazol benutzt, um eine ausreichende Pufferkapazität zu sichern.
Die Reversibilität der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase wurde von PETERS et al. (1974) für den gekoppelten Einsubstrat-Assay modifiziert und nach dem folgenden Schema durchgeführt:

Versuch	A	B	C	D
	Medium	Medium	Medium	Medium
	Enzym	Enzym	Enzym	Enzym
	Testsubstanz Konz. A	Testsubstanz Konz. A	Testsubstanz Konz. A/10	-

Nach einer 15-minütigen Präinkubation wurden ATP und NADH zugegeben. Die Aktivität wurde gemessen und die Ansätze 1:10 mit Medium verdünnt. Mit 2 ml eines jeden Umsatzes wurde der folgende Assay hergestellt:

A	B	C	D
Medium	Medium	Medium	Medium
1/10 Enzym	1/10 Enzym	1/10 Enzym	1/10 Enzym
Testsubstanz Konz. A	Testsubstanz Konz. A/10	Testsubstanz Konz.A/10	-

Nach 30-minütiger Präinkubation wurden ATP und NADH zugegeben und die Aktivität gemessen.
Die Endkonzentrationen des Mediums an Pyruvat-Kinase, Lactat-Dehydrogenase, Phosphoenolpyruvat, Na^+-,K^+- und Mg^{++}-Ionen ATP und NADH waren gleich groß wie in dem schon beschriebenen,

gekoppelten Assay und wurden während des Versuches konstant gehalten. Die prozentuale Hemmung in den Ansätzen A, B und C wurden im Vergleich zu D als Kontrolle ausgerechnet. Nach der 1:10 Verdünnung und 30 min Inkubation wurde die Neigung der Hemmungskurve in D zu A oder C als % Reversibilität ausgerechnet.

B.8. ^{14}C-ATP-Bindung an die Na^+,K^+-aktivierbare ATPase

Die ^{14}C-ATP Bindungsstudien mit der Na^+,K^+-ATPase wurden mit der "Rapidmixing Centrifugation" Methodik von HEGYVARY und POST (1971) vorgenommen. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D für ATP wurden 0,5 - 1,0 mg Enzymprotein in einem Endvolumen von 1,05 ml bei 0° C mit 60 mM Tris-EDTA-Puffer (pH 7,0) und 1 bis 6 µM ATP plus 1 x 10^5 cpm [8 - ^{14}C]-ATP - Tetranatriumsalz angesetzt. Der Ansatz wurde sofort 10 min bei 50.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Röhrcheninnenwände mit Wattestäbchen gesäubert. Um den Niederschlag zu lösen, wurde er in 1 ml 1N NaOH 30 min bei 50° C inkubiert. Diese Lösung wurde mit 500 µl 2N HCL neutralisiert und 1 ml davon zu jeweils 10 ml Unisolve 1 Szintillationsflüssigkeit gegeben. Die Radioaktivität wurde in einem Packardzähler bestimmt. Um in einer weiteren Probe das ungebundene ^{14}C-ATP im Niederschlag zu bestimmen wurde unmarkiertes ATP bis zu einer Endkonzentration von 10 mM vor Zugabe von markierter Substanz zugemischt. Ungebundenes ATP wurde vom gesamten ATP abgezogen, um den Gehalt an gebundenem ATP zu bekommen.

Der Versuch,in Anwesenheit von den zu untersuchenden Substanzen wurde wiederholt, um ihren Einfluß auf die Affinität von ATP zur Na^+,K^+-ATPase festzustellen. Ferner wurde die Wirkung von Kationen auf die Affinität untersucht. Die Konzentrationen von ATP betrugen 0,9 und 2,4 µM zusammen mit der Menge an radioaktiv markierten ATP, in Anwesenheit von einer

Dosisreihe der Testsubstanz. Um eine dosisabhängige Beeinflussung der Testsubstanz zu untersuchen, wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt.

B.9. Na^+-Ionen abhängige γ ^{32}P-ATP-Phosphorylierung

Diese Versuche wurden in Anlehnung an die Arbeiten von SKOU und HILBERG (1969) und KLODOS und SKOU (1975) durchgeführt. 200 µl Nieren-ATPase (≙ 0,5 mg Protein) wurden in einem Endvolumen von 2,3 ml mit 50 mM Trispuffer pH 7,4, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM Na_2EDTA, 100 mM NaCl und 0,5 mM P_i 15 min bei 0° C inkubiert. Nun wurden 100 µl einer Na_2ATP Lösung mit einer Endkonzentration von 1,25 - 12,5 µM und 1 - 5 x 10^5 cpm ^{32}P- γ-ATP hinzugegeben und nach 10 s mit 2 ml 5%iger TCA, 0,1 M P_i-Lösung gestoppt. Anschließend wurde in der Ultrazentrifuge 10 min bei 25.000 g zentrifugiert, die überstehende Lösung verworfen und der zurückbleibende Niederschlag noch zweimal mit 2 ml 5%iger TCA, 0,1 M P_i-Lösung gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation und dem Verwerfen der überstehenden TCA-Lösung wurde der Niederschlag in 1 ml 1 N NaOH aufgenommen und im Wasserbad bei 50° C gelöst. Bei Raumtemperatur wurden anschließend 0,5 ml 2 N HCl zur Neutralisation hinzugefügt und diesem Ansatz 1 ml entnommen, der in Szintillationsflüssigkeit Triton 1 überführt und in einem Packardcounter gezählt wurde. Daneben wurde ein Kontrollwert angesetzt, der aus 100 µl ^{32}P/ATP-Lösung und 900 µl aq. dest. bestand. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die unspezifische Bindung wurde im Niederschlag in Abwesenheit von 16 mM KCl und 5 mM $MgCl_2$ gemessen (TOBIN et al., 1973). Die Phosphorylierung wurde zunächst bei verschiedenen Konzentrationen von ATP und NaCl vorgenommen und zur Feststellung der optimalen Zeitbedingungen wurde die Phosphorylierung mit verschiedenen Zeitintervallen durchgeführt.

Die Na-abhängige Phosphorylierung wurde dann in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz durchgeführt.

In Anwesenheit von 10 µg/ml Oligomycin wurde eine Phosphorylierung unter Einfluß der Testsubstanz durchgeführt. Bei dieser Konzentration hemmt Oligomycin bei 0° C die gesammte Na^+,K^+-ATPase u.a. durch eine Hemmung des Schrittes (2 a) (ROBINSON, 1971). Oligomycin wurde in einer Äthanol-Lösung gelöst, die keinen eigenen Effekt zeigte.
Zur Hemmung des Schrittes (2 a) wurde das Enzym vor der Phosphorylierung in Anlehnung an die Methodik von HEGYVARY (1976) und SCHOOT et al. (1977) mit NEM behandelt. In einem Endvolumen von 1 ml wurden 0,5 mg Nieren-Na^+,K^+-ATPase mit 20 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 2 mM CDTA und 10 - 0,1 mM NEM 30 min bei 37° C inkubiert und die Reaktion mit 5 ml eiskaltem Tris-HCl-Puffer pH 7,4 und 10 mM 2-Mercaptoäthanol gestoppt. Die Ansätze wurden 10 min bei 20.000 g zentrifugiert und die überstehende Lösung verworfen. Der zurückgebliebene Niederschlag wurde zweimal mit 5 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 gemischt und zentrifugiert. Ein Teil der Proben wurden in 400 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 aufgenommen und die Na^+,K^+-ATPase-Aktivität gemessen. Der Rest wurde in 200 µl Puffer aufgenommen und wie oben phosphoryliert. Eine NEM Konzentration wurde bestimmt, bei der 90 % Hemmung der Na^+,K^+-ATPase, aber nur 40 % Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung auftritt. Sie betrug 5 mM und wurde zur Durchführung der Phosphorylierung verwendet.

B.10. Spontane K^+- und ADP-abhängige Dephosphorylierung

Zur Untersuchung der spontanen und K^+-abhängigen Dephosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase wurde die von Post et al. (1969) beschriebene Methodik verwendet.
0,5 mg Nieren-Na^+,K^+-ATPase wurde wie oben bei 0^o C phosphoryliert. Nach 10 s Inkubation wurde eine kalte ATP-Lösung von 0,2 mM Endkonzentration im Überschuß zugegeben und nach weiteren 10 s die Reaktion mit TCA gestoppt. Einige Ansätze wurden nicht mit überschüssigem ATP behandelt, um eine 100%ige Phosphorylierung zu bekommen.
Das überschüssige ATP gewährleistete, daß eine vollständige Phosphorylierung mit unmarkiertem Phosphat stattfinden mußte, wobei die Messung der jeweiligen Radioaktivität ein Maß für die spontane Dephosphorylierung war. Versuche wurden auch unter Zusatz von 10 mM KCl durchgeführt. Die Ergebnisse dienten als Maß für die K^+-abhängige Dephosphorylierung. Spontane und K^+-abhängige Dephosphorylierung wurden unter Zusatz von 5,7 µM BIIA, 200 µM g-Strophanthin, 5 mM NEM und 10 µg/ml Oligomycin untersucht. Die von POST et al. (1969) beschriebene ADP-abhängige Dephosphorylierung, Schritt (2 b) in dem ATPase-Schema (siehe Einleitung), wurde in Anwesenheit von BIIA, NEM und Oligomycin untersucht. Das Enzym wurde wie oben (B.9.) 10 s in Anwesenheit von Oligomycin (10 µg/ml) phosphoryliert und dann dephosphoryliert 10 s mit 1) 2,5 mM ADP, 2) 2,5 mM ADP und 5,7 µM BIIA und 3) der gleichen Menge an Aq. bidest für den Kontrollwert bei 100%iger Phosphorylierung

B.11. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Es wurden 1 mM BIIA-Lösung verwendet. Das UV-Absorptionsmaximum wurde bei 279,5 nm gemessen. 1,5 ml der 1 mM BIIA-Lösung wurde mit 4,5 ml Sörensen-Pufferlösung jeweils pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; und 8,0 verdünnt. 2 ml der Mischung wurden 1:20 verdünnt und bei 279,5 nm analysiert. Die restlichen

4 ml der unverdünnten BIIA-Pufferlösung wurden 15 min mit 1 ml Octanol kräftig geschüttelt und anschließend 5 Minuten bei 4.000 g zentrifugiert. Die Octanolphase wurde abgesaugt und mit Octanol 1:20 verdünnt, um die UV-Absorption zu bestimmen. Der Verteilungskoeffizient wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$P = \frac{E_W - E_{extr.}}{E_{extr.}\ f}$$

E_W = Extinktion in der wässrigen Phase
$E_{extr.}$ = Extinktion nach Extraktion mit Octanol
f = 0,25 (bei Verhältnis Octanol : Puffer 1 : 4,

Diese Werte wurden bei jedem pH gemessen.

B.12. Bestimmung der Dissoziationskonstanten

5 mg BIIA (13,46 µMole) wurden in 20 ml entionisiertem Wasser mit 0,1 N Natronlauge(Titrisol®) titriert. Nach jeder 20 µl-Zugabe wurde der pH gemessen. Die Temperatur wurde auf 37° C konstant gehalten. Die Dissoziationskonstanten wurden nach der HENDERSON-HESSELBACH-Gleichung berechnet (ARMSTRONG und BARKOW, 1976).

$$pKa = pH + \log \left[\frac{BH^+}{B}\right]$$

pKa = Dissoziationskonstante
B = Base

Ergebnisse

C.1. Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA im Vergleich mit anderen Hemmstoffen

Die im methodischen Teil ausführlich beschriebenen Enzympräparationsmethoden wurden zur Isolierung der Na^+,K^+-ATPase aus Meerschweinchenherz, -nieren und -hirn verwendet. Die mit dem gekoppelten spektralphotometrischen Assay gemessenen Aktivitäten sind in Tab. 1 (für Inkubationsbedingungen s. Methodik) aufgeführt. Die höchste Aktivität und der höchste prozentuale Anteil an Na^+,K^+-ATPase wurde im Nierenenzym gefunden. Daher wurde dieses Enzym für weitere Untersuchungen benutzt. Die Eigenschaften der Nieren-ATPase unterscheiden sich nicht stark von Enzymen anderen Organursprungs. Die Enzyme wurden bei -20° C bis zu 3 Wochen ohne signigikante Abnahme der Aktivität aufbewahrt. Der Na^+,K^+-aktivierbare Anteil des Herzenzyms nahm sogar im Laufe der Zeit zu, während gleichzeitig die Mg^{++}-Aktivität abnahm.

Tab. 1

Membran-ATPase Aktivitäten aus verschiedenen Meerschweinchenorganen, gemessen mit der gekoppelten Ein-Substrat-Reaktion.

	Herz	Nieren	Hirn
Na^+,K^+-ATPase	45,2 ± 5,6	190,1 ± 16,4	171,2 ± 7,8
Mg^{++}-ATPase	48,6 ± 4,7	4,1 ± 11,5	9,8 ± 1,3

Aktivität = µM PO_4^{3-}/(mg Protein.Stunde)
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ von 4 Enzympräparaten

Die Werte der Aktivitätsmessung durch Messung des anorganischen Phosphates lagen eine Zehnerpotenz niedriger.

Die in Tab. 2 aufgeführten ID_{50}-Werte (Konzentrationen, die eine 50%ige Hemmung bewirken) und in Abb. 3 dargestellten Dosiswirkungskurven zeigen die Affinität von BIIA für die aus verschiedenen Geweben des Meerschweinchens isolierte Na^+,K^+-ATPase.

Die Wirksamkeit von BIIA auf die Na^+,K^+-ATPase verschiedener Meerschweinchenorgane zeigt die Reihenfolge: Herz> Niere> Hirn. Große Empfindlichkeitsunterschiede von Na^+,K^+-ATPase verschiedener Organe wurden in Bezug auf BIIA bisher nicht festgestellt. Ein gegenüber Herzglykosiden relativ unempfindliches Enzym, die Rattenherz-Na^+,K^+-ATPase (REPKE,1965; DRANSFELD et al., 1966) wurde durch BIIA auch gehemmt. Der ID_{50}-Wert betrug 31 µM.
Es bleibt zu berücksichtigen, daß BIIA zu der Gruppe der Na^+,K^+-ATPase hemmenden Substanzen gehört, die eine vollständige Hemmung bei einer Konzentration von weniger als 10^{-3} M verursachen. Zu dieser Gruppe gehören u.a. die Herzglykoside und die Erythrophleumalkaloide (BONTING et al., 1964). Im Vergleich hierzu erreichen hemmende Substanzen wie Ethacrynsäure und Oligomycin selbst bei sehr hoher Dosierung keine vollständige Hemmung (HOOK, 1969; ROBINSON, 1971).

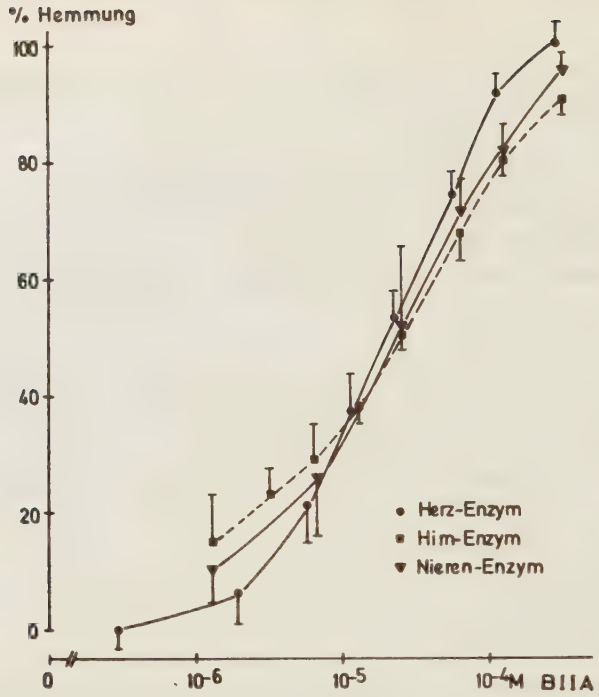


Abb. 3: Dosiswirkungskurve für die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase aus verschiedenen Meerschweinchenorganen
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n = 4

	Herz	Hirn	Nieren
ID_{50} µM	20,3 ± 0,8	38,9 ± 0,2	24,1 ± 0,1

Tab. 2: Hemmung der Na^+,K^+-ATPase aus verschiedenen Meerschweinchenorganen durch BIIA
$ID_{50} = \bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

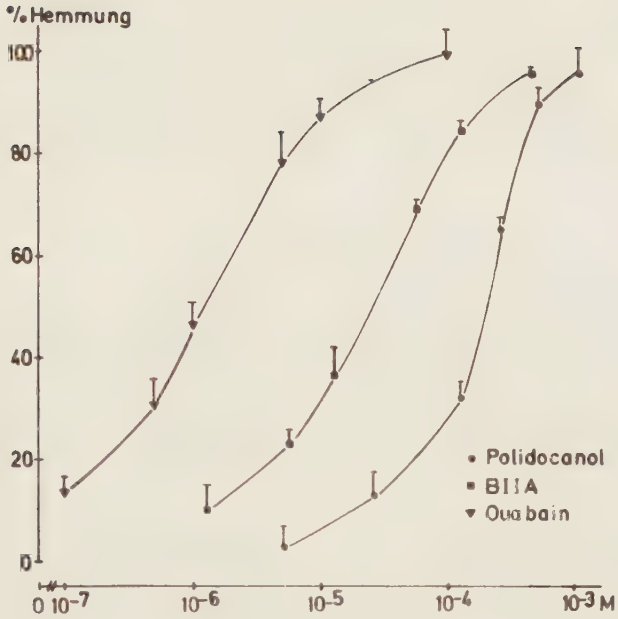


Abb. 4: Dosiswirkungskurve für die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase aus Meerschweinchennieren durch verschiedene Substanzen.

	Ouabain	BIIA	Polidocanol
ID_{50} µM	1,11 ± 0,1	24,1 ± 0,1	150,1 ± 6,3

Tab. 3: Hemmung der Na^+,K^+-ATPase aus Meerschweinchennieren durch verschiedene Verbindungen.
$ID_{50} = \bar{x} \pm s_x$

Die in Tab. 3 dargestellten mit der Logit-Transformation ausgerechneten ID_{50}-Werte und die entsprechenden Dosiswirkungskurven (Abb. 4) demonstrieren die unterschiedliche Empfindlichkeit der Meerschweinchen-Nieren-ATPase gegenüber hemmenden Substanzen. Polidocanol (Thesit^{R}) ist eine stickstoffreie,nichtionogene, aliphatische Verbindung mit einem Molekulargewicht von ca. 600. Die chemische Strukturformel ist folgende:

$$C_{12}H_{25}\text{-}(O\text{-}C_2H_4)n\text{-}OH$$

wobei n ca. 9 beträgt. Die Substanz besitzt neben dem lipophilen Dodecylrest eine hydrophile Ätherkette und wird in der Klinik als Oberflächenanästhetikum verwendet. Es ergibt sich folgende Abstufung der Wirksamkeit und Affinität: Ouabain > BIIA > Polidocanol. Ouabain ist ca. 20-fach wirksamer als BIIA und BIIA ca. 6-fach wirksamer als Polidocanol.

Die Dosiswirkungskurven in Abb. 5 und die mit der Logit-Transformation ausgerechneten ID_{50}-Werte in Tab. 4 zeigen die unterschiedliche Wirksamkeit innerhalb der Gruppe der Herzglykoside. Die dihydrierten Metaboliten z.B. sind viel weniger wirksam als die Muttersubstanzen.

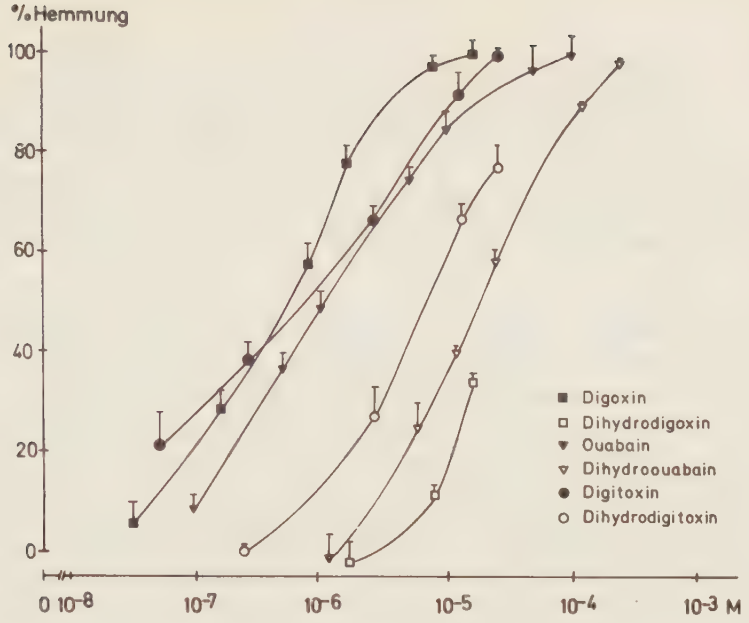


Abb. 5: Dosiswirkungskurven für verschiedene herzwirksame Glykoside und ihre Metaboliten bei Verwendung von Na^+,K^+-ATPase aus Meerschweinchenherz.
Als Streuung sind $s_{\bar{x}}$ -Werte eingezeichnet.

Substanz	ID_{50} µM
Digitoxin	0,55 ± 0,05
Dihydrodigitoxin	7,16 ± 0,44
Digoxin	0,7 ± 0,09
Dihydrodigoxin	ca. 36
Ouabain	1,17 ± 0,07
Dihydroouabain	13,88 ± 0,61

Tab. 4: Hemmung der N^+,K^+-ATPase aus Meerschweinchen-Herz durch verschiedene Herzglykoside.
$ID_{50} = \bar{x} \pm s_x$, n = 4

BIIA hemmt zusätzlich die Mg^{++}-aktivierbare ATPase, jedoch erst bei höherer Dosierung. Eine 450 uM Lösung bewirkt eine 40%ige Hemmung, während 4,5 µM keine Wirkung zeigt.

C.2. Einfluß von $[Na^+]$, $[K^+]$, $[Mg^+]$, und $[ATP]$ auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA.

a) Einfluß auf die Aktivierung der Na^+,K^+-ATPase durch $[Na^+]$

Die Aktivierung der Na^+,K^+-ATPase durch Na^+ wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von BIIA untersucht. Die Na^+-Konzentration wurde bei gleichbleibender K^+- und Mg^{++}-Konzentration stufenweise erhöht. Bei K^+-Konzentrationen von 5 und 15 mM wurde $[Na^+]$ von 25 bis 150 mM variiert. In Abb. 6 sind die Ergebnisse in Form eines Lineweaver-Burk-Plots dargestellt (Lineweaver und Burk , 1934). Die Zugabe von BIIA bewirkte eine Zunahme der K_m für Na^+, ohne V_{max} zu beeinflussen. Der Kurvenverlauf läßt auf eine Hemmung schließen, die kompetitiv gegenüber Na^+ ist. Bei 5 mM K^+ beträgt $K_{0.5}$ für Na^+ (Konzentration für 50 % Aktivierung des Enzyms) 7,48 mM und in Anwesenheit von 11,4 µM BIIA 50 mM. Bei 15 mM K^+ beträgt $K_{0.5}$ für Na^+ 13,69 mM und in Anwesenheit von 11,4 µM BIIA 98,33 mM. Die Zunahme der $K_{0.5}$ für Na^+ mit zunehmenden K^+-Konzentrationen in Abwesenheit hemmender Substanzen wurde auch von Robinson (1977) festgestellt.

Zunächst wurde die Konzentration von BIIA unter Zusatz von 40 und 150 mM Na^+ von 1.14 bis 57 µM geändert und die Aktivität der Na^+,K^+-ATPase gemessen. Die Ergebnisse sind in Form einer Darstellung nach Dixon in Abb. 7 zu sehen (Dixon und Webb, 1959). Der Abszissenwert des Schnittpunktes beider Kurven ist der K_i-Wert für BIIA (Dissoziationskonstante). Er beträgt 3,8 µM.

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen $[Na^+]$ -Abhängigkeit der BIIA-Wirkung stellte Skou (1971) fest, daß die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch Ouabain mit zunehmender Na^+-Konzentration verstärkt wurde.

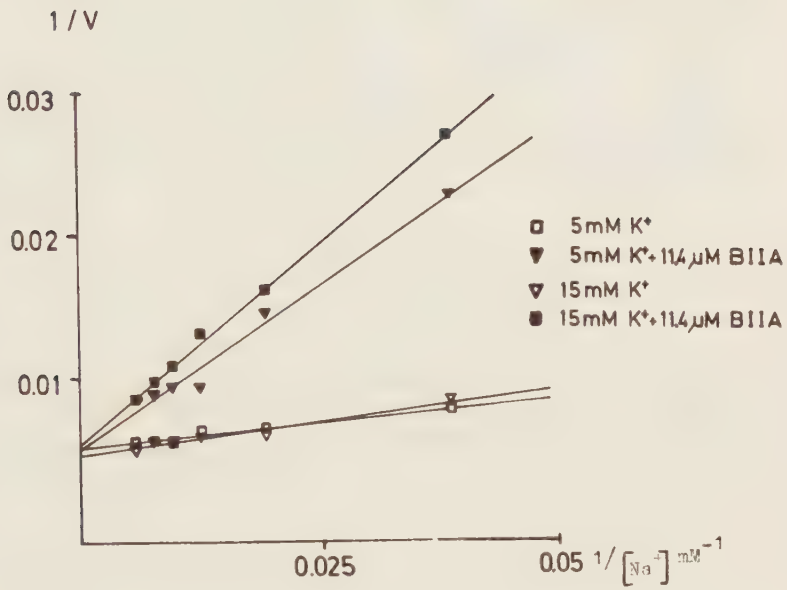


Abb. 6: Darstellung nach Lineweaver und Burk der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA in Abhängigkeit von der Na^+- und K^+-Konzentration.
V = μMPO_4^{3-}/(mg.Protein.Stunde)

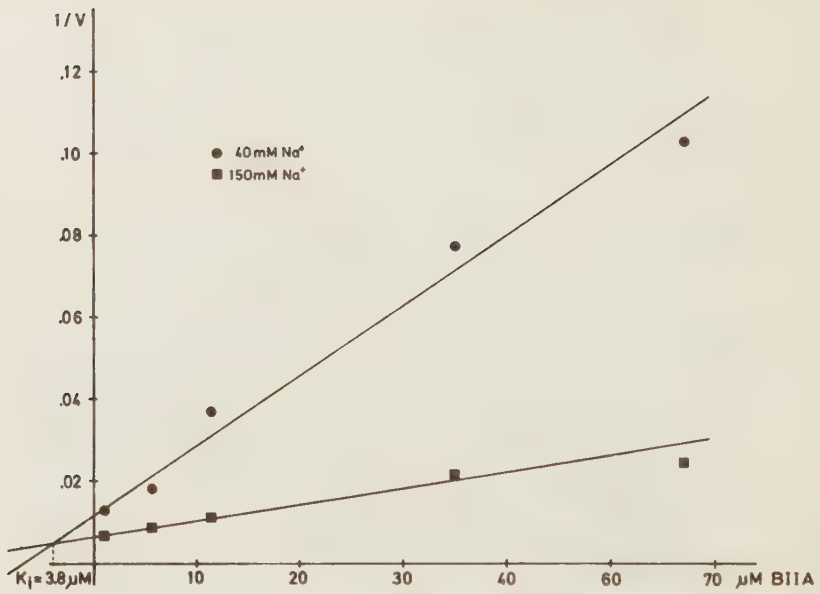


Abb. 7: Darstellung nach Dixon für die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA in Abhängigkeit von der Na^+-Konzentration.

V = μMPO_4^{3-}/(mg. Protein . Stunde)

b) Einfluß von $[K^+]$ auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA

Aus Abb. 6 wurden die K_i-Werte für BIIA unter Zusatz von 5 und 15 mM K^+ ermittelt. Mit zunehmender K^+-Konzentration von 5 bis 15 mM nahm der K_i-Wert für BIIA von 2,22 bis 1,64 µM ab, d.h. die Affinität von BIIA für das Enzym nahm zu. Diese Beobachtung wurde durch eine zunehmende ID_{50} für BIIA mit zunehmender K^+-Konzentration bestätigt (siehe Tab. 5).

$[K^+]$ mM	ID_{50} [µM]
2,0	92,3 ± 3,8
3,5	58,2 ± 0,3
5,0	32,4 ± 1,2
10,0	24,1 ± 1,2

Tab. 5: Einfluß von K^+ auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA.
$ID_{50} = \bar{x} \pm s_x$, $n = 4$

Eine Verstärkung der Hemmung durch K^+-Ionen wurde in einem Konzentrationsbereich von 25 - 150 mM Na^+ und 5 - 20 mM K^+ gefunden (siehe Abb. 8). Im Gegensatz zu diesen Befunden kann die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase bei niedrigen Konzentrationen von Ouabain durch K^+-Ionen komplett aufgehoben werden, wobei eine kompetitive Reaktionskinetik zu beobachten ist. Bei höheren Ouabain-Konzentrationen ist die Kinetik gemischt kompetitiv und nicht kompetitiv (Glynn, 1957; Kyte, 1972 und Schatzmann, 1965).

Eigene Ergebnisse über den Einfluß von K^+-Ionen auf die ID_{50} für Ouabain sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Es tritt eine deutliche antagonistische Wirkung von K^+ gegenüber Hemmwirkung von Ouabain auf. Im Gegensatz hierzu hemmt BIIA die Na^+,K^+-ATPase kompetitiv gegenüber Na^+ in einem großen Na^+-Konzentrationsbereich (siehe Abb. 7).

$[K^+]$ mM	ID_{50} [µM]
2,0	0,64 ± 0,06
3,5	0,91 ± 0,07
5,0	1,71 ± 0,11
15,0	2,08 ± 0,12

Tab. 6: Einfluß von $[K^+]$ auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch Ouabain.

$ID_{50} = \bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n = 6$

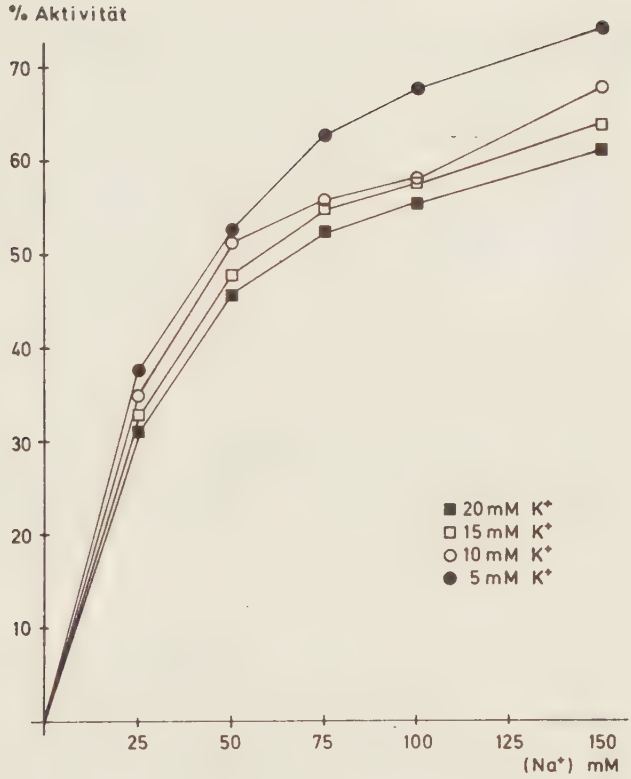


Abb. 8: Prozentuale Aktivität der Na^+,K^+-ATPase in Anwesenheit von 11,4 µM BIIA und verschiedenen Na^+- und K^+-Konzentrationen.

c) Einfluß von $[Mg^{++}]$ auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA

Die Aktivität der Na^+,K^+-ATPase wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von BIIA nach stufenweiser Erhöhung der Mg^{++}-Konzentration untersucht, während die Na^+- bzw. K^+- Konzentration mit 100 mM bzw. 15 mM konstant gehalten wurde. Die ID_{50}-Werte für BIIA in Anwesenheit von 1, 3, 5 und 15 mM Mg^{++} sind in Tab. 7 angegeben. Es wurde kein signifikanter Einfluß von Mg^{++}-Ionen auf die Hemmwirkung von BIIA festgestellt.

$[Mg^{++}]$ mM	ID_{50} [µM]
1	28,0 ± 1,7
3	24,1 ± 1,2
5	22,6 ± 1,5
15	24,6 ± 1,5

Tab. 7: ID_{50}-Werte für BIIA bei verschiedenen Mg^{++}-Konzentrationen.

$ID_{50} = x \pm s_x$, $n = 4$

d) Einfluß von [ATP] auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA

Die Aktivität der Na^+,K^+-ATPase wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von BIIA bei zunehmender Substratkonzentration und gleichbleibender Na^+-K^+-bzw. Mg^{2+}-Konzentration (100 mM, 15 mM bzw. 5 mM) gemessen. In Abb. 9 sind die Ergebnisse in Form einer Linewearer-Burk-Darstellung wiedergegeben. Unter Zusatz von BIIA nehmen die Parameter V_{max} und K_m beide um denselben Faktor ab. Damit sind die Bedingungen für eine unkompetitive Hemmung erfüllt. Da ATP Mg^{2+}-Ionen komplexiert, nimmt die Konzentration an nicht-komplexierten Mg^{++}-Ionen ab. Jedoch hat eine Abnahme der Mg^{++}-Konzentration keinen Effekt auf die Wirksamkeit von BIIA (siehe Tab. 7).
Eine Förderung der Hemmung durch ATP geht aus den ID_{50}-Werten in Tab. 8 hervor. Je höher die ATP-Konzentration ist, um so stärker wird die Na^+,K^+-ATPase durch die jeweilige BIIA-Konzentration gehemmt.

[ATP] mM	ID_{50} [µM]
0,2	62,4 ± 4,7
0,5	48,8 ± 3,1
1	46,5 ± 2,5
2	27,5 ± 1,8
3	23,3 ± 1,5

Tab. 8: Abhängigkeit der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA von der ATP-Konzentration.

$ID_{50} = \bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n = 4$

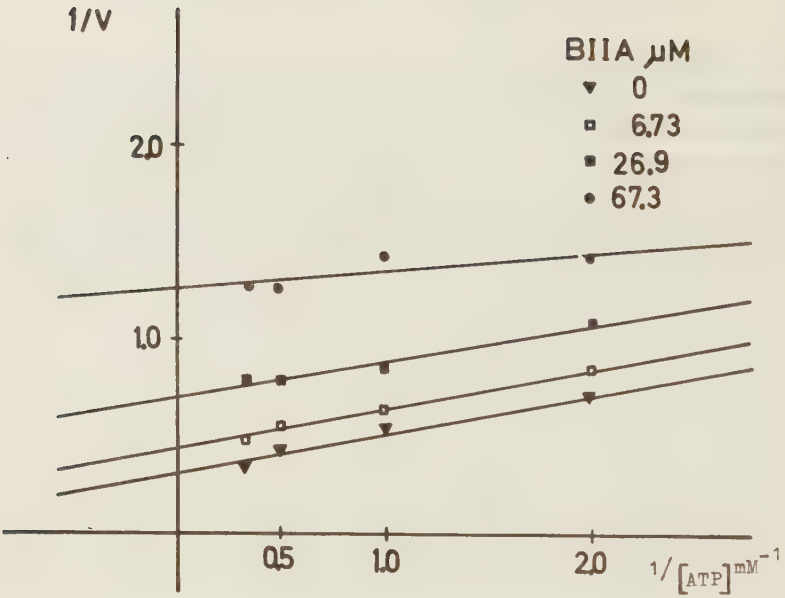


Abb. 9: Lineweaver-Burk-Abbildung für die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA in Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration.

Skou et al., 1971, haben einen komplizierten Zusammenhang zwischen Mg^{2+} - und ATP-Konzentrationen und der Hemmung der Na^{+},K^{+}-ATPase durch Ouabain gefunden. Bei ATP-Konzentrationen, die größer als die Mg^{2+}-Konzentrationen sind, wird die "Steady-State"-Hemmung durch Ouabain partiell aufgehoben, während ATP-Konzentrationen, die niedriger als die Mg^{2+}-Konzentrationen bleiben, eine Verstärkung der Hemmung bewirken. Dies bedeutet, daß die Hemmung von der freien Mg^{++}-Konzentration abhängt.

C.3. Einfluß der Temperatur auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA

Die Aktivität der Na^+,K^+-ATPase wurde bei Temperaturen von 25° C - 41° C in Abwesenheit und Anwesenheit von 11,4 µM BIIA gemessen. Die in Tab. 9 angegebenen Enzymaktivitäten geben die Temperaturabhängigkeit wieder. Einer optimalen Aktivität bei 39° C entspricht eine Hemmung von 44,02 % ± 0,97 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). Bei 41° C beträgt die Hemmung dagegen nur 34,41 %.

Temperatur °C	Aktivität	% Hemmung durch 11,4 uM BIIA
25	43,70	43,64
27	50,85	46,88
30	59,59	40,00
33	78,66	43,43
37	107,27	45,93
39	123,95	44,23
41	122,36	34,41

Tab. 9: Temperaturabhängigkeit der Na^+,K^+-ATPase-Aktivität und deren Hemmung durch BIIA.
Aktivität = µM PO_4^{3-}/(mg. Protein . Stunde)

Um die Aktivierungsenergie E für die enzymatische Aktivität der Na^+,K^+-ATPase mit und ohne BIIA zu bestimmen, wurde die Geschwindigkeit der Enzymreaktion in Abhängigkeit von der absoluten Temperatur untersucht.

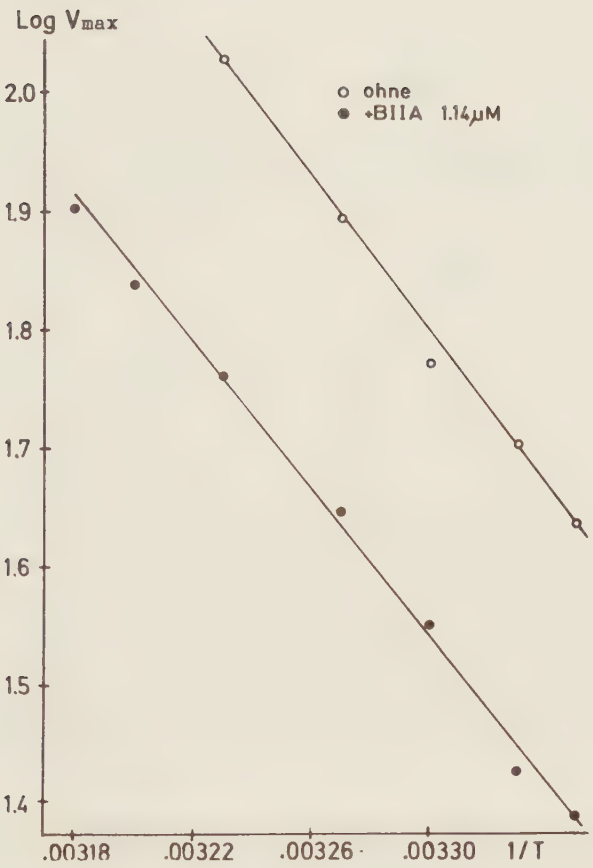


Abb. 10: Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Na^+,K^+-ATPase.

Gemäß der integrierten Arrhenius-Gleichung in ihrer allgemeinen Form gilt:

$$\text{Log } K = \frac{-E}{2{,}303 \cdot R.T.} + \text{Konstante}$$

Es bedeuten K die Reaktionsgeschwindigkeit, R die allgemeine Gaskonstante (1,987 cal/Grad.Mol), E die Aktivierungsenergie und T die absolute Temperatur. Trägt man nun für die Enzymreaktion log V_{max} gegen 1/T auf (Abb. 10), so läßt sich aus der Steigerung $(\frac{-E}{2{,}303 \cdot R})$ die Aktivierungsenergie E berechnen.

Für die Na^+,K^+-ATPase beträgt E 13,83 Kcal/mol und nach Zusatz von 11,4 µM BIIA 13,78 Kcal/Mol. BIIA zeigt demnach kaum einen Einfluß auf die Temperaturabhängigkeit der Enzymreaktion und damit ihrer Aktivierungsenergie. Die Korrelationskoeffizienten für beide Kurven in Abb. 10 betragen 0,97. Charnock (1973) hat für die Kaninchennieren-Na^+,K^+-ATPase im gleichen Temperaturbereich eine Aktivierungsenergie von 17,80 Kcal/Mol gefunden. Im Gegensatz zu den Befunden mit BIIA wurde von Erdmann und Schoner (1973) festgestellt, daß mit abnehmender Temperatur die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch Ouabain abnahm. Die Autoren führen dies auf eine Verzögerung des langsamen Prozesses der Assoziation von Ouabain mit dem Rezeptor zurück.

C.4. Reversibilität der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA

Die Reversibilität der Bindung des Enzym-Substrat-Komplexes an BIIA und Ouabain wurde mit der in Teil B.7. dieser Arbeit beschriebenen Methodik bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengefaßt. Nach einer 10-fachen Verdünnung des Enzymproteins und der Substratkonzentrationen war die Hemmung durch BIIA in Ansatz B ungefähr gleich der in C,

d.h. innerhalb einer 3o-minütigen Inkubation wurde die Hemmung durch 30 µM BIIA auf eine 3 µM BIIA entsprechende Hemmung vermindert. Der Bildung des BIIA-Enzymkomplexes war demnach 100 % reversibel. Für Ouabain in Ansatz B war die Hemmung nur zu 25 % reversibel. Das Ergebnis für Ouabain stimmt mit den Befunden von Peters et al. (1974) überein.

	A	B	C	D
BIIA µM	30	30	3	0
Aktivität	86.5 ± 1.0	88.1 ± 1.3	141.6 ± 2.2	193.8 ± 3.9
% Hemmung	55.3 ± 2.8	54.4 ± 4.0	26.7 ± 6.4	

Nach 10-facher Verdünnung und 30 Minuten Inkubation:

BIIA µM	30	3	3	0
Aktivität	6.8 ± 3.8	17.2 ± 8.1	16.9 ± 7.7	23.9 ± 6.2
% Hemmung	70.5 ± 3.4	24.2* ± 1.1	25.3 ± 0.4	

*100 % Reversibilität

	A	B	C	D
Ouabain	50	50	5	0
Aktivität	6.1 ± 3.6	31.8 ± 4.2	29.8 ± 2.8	128.9 ± 2.8
% Hemmung	95.3 ± 2.7	95.3 ± 2.2	76.9 ± 4.6	

Nach 10-facher Verdünnung und 30 Minuten Inkubation:

Ouabain	50	5	5	0
Aktivität	0.7 ± 0.4	0.9 ± 0.7	1.5 ± 1.2	10.7 ± 5.7
% Hemmung	93.9 ± 1.6	91.8** ± 0.8	85.7 ± 2.7	

**25 % Reversibilität

Aktivität = µM PO_4^{3-}/(mg.Protein.Stunde). $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ · n = 4

Hemmung bedeutet die Differenz zu den Kontrollsätzen ohne Hemmstoff.

Tab. 10: Reversibilität der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA und Ouabain.

C.5. Einfluß der Präinkubation auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA

Die Na^+,K^+-ATPase wurde 1, 5 und 15 min bei 37° C mit und ohne Ionenzusatz (100 mM Na^+, 15 mM K^+ und 5 mM Mg^{++}) und in Abwesenheit und Anwesenheit von 30 µM BIIA präinkubiert und die Reaktion mit oder ohne Ionenzusatz und ATP gestartet. Die in Tab. 11 angegebenen % Hemmungen zeigen, daß der Einfluß von BIIA auf die ATPase innerhalb von einer Minute vollständig war, und zwar unabhängig von der Gegenwart von Ionen im Präinkubationsmilieu. Die Aktivität des Enzyms hat ohne Ionenzusatz von 5 bis 15 min Präinkubationszeit 16 % abgenommen, während sie in Anwesenheit von Ionen gleichgeblieben ist.

Zeit Min.	% Hemmung Präinkub. ohne Ionen	% Hemmung Präinkub.mit Ionen
1	74.93 ± 1.31	71.60 ± 1.56
5	75.92 ± 1.40	70.54 ± 1.34
15	72.93 ± 2.03	73.52 ± 1.75

Tab. II: Einfluß der Präinkubationszeit auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA.
BIIA = 30 µM, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n = 4

Zusätzlich werden unterschiedliche BIIA-Konzentrate 5 min in Anwesenheit der oben erwähnten Ionen und 3 mM ATP bei 37° C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe des Enzyms statt Substrat gestartet. Diese geänderte Reihenfolge hatte keinen Effekt auf die ID_{50} der Hemmung.

Im Gegensatz zu diesen Befunden hat Schwartz (1970) festgestellt, daß die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch Ouabain in Anwesenheit von 2,5 mM ATP, 100 mM Na^+ und 5 mM Mg^{++} innerhalb von 3 min maximal ist.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von 10 mM K^+ war die Hemmung erst nach 30 min vollständig. Während einer Präinkubation mit Puffer und Enzym wurde Ouabain kaum gebunden und eine Hemmung erfolgte nur nach Zugabe von Ionen und Substrat.

C.6. Lipidlöslichkeit, Ionisationsgrad und Wirksamkeit von BIIA

Die Aktivität der Na^+,K^+-ATPase wurde bei pH 6.0; 6.5; 7.0; 7.5 und 8.0 gemessen. Das pH-Optimum lag bei 7.5. Bei 8.0 nahm die Aktivität bereits um 40 % ab. Die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch 30 µM BIIA wurde ebenfalls bei diesen pH-Werten gemessen. Bis pH 7,5 bewirkte eine Erhöhung des pH-Wertes eine Zunahme der Hemmung (siehe Abb. 11). Bei pH 8.0 nahm die Hemmung wieder ab. Der Verteilungskoeffizient von BIIA und damit dessen Lipidlöslichkeit wurde nach der in Teil B.11. beschriebenen Methode bei den oben erwähnten pH-Werten bestimmt. Abb. 9 zeigt zwischen pH 6.5 und 7.5 mit zunehmender Lipidlöslichkeit eine Zunahme der prozentualen Hemmung. Um die Wirksamkeit von BIIA mit dem Ionisationsgrad zu korrelieren, wurde die Dissoziationskonstante von BIIA nach der in B.12. beschriebenen Methodik bestimmt. Das Ergebnis der Titration einer BIIA-Lösung mit NaOH ist in Abb. 12 dargestellt. Aus der Henderson-Hasselbach-Gleichung wurde ein K_D-Wert von 7.01 errechnet. Bei Zugabe von Natronlauge nahm die Konzentration des basischen BIIA-Anteils bis zu einer maximalen Löslichkeit von 0,5 mM zu, so daß die Titration wegen der Ausfällung der Base beendet werden mußte. Trägt man die aus der Henderson-Hasselbach-Gleichung errechnete Konzentration des basischen Anteils von BIIA gegen die prozentuale Hemmung auf (Abb. 13), so resultiert eine Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 1.

Yoda und Yoda (1978) inkubierten(^{3}H)-Ouabain mit Na^+,K^+-ATPase, 100 mM Na^+, 4 mM Mg^{++} und 4 mM ATP und fanden bei pH 6.5 und 8.0 eine gleichartige Zeitabhängigkeit der Bindung von Ouabain und der maximalen Hemmung der Na^+,K^+-ATPase. Dagegen nahmen die Assoziationskonstante und Dissoziationskonstante für die Ouabainbindung in Anwesenheit von 4 mM Mg^{++} und 4 mM anorganischem Phosphat bei pH 8.0 ab.

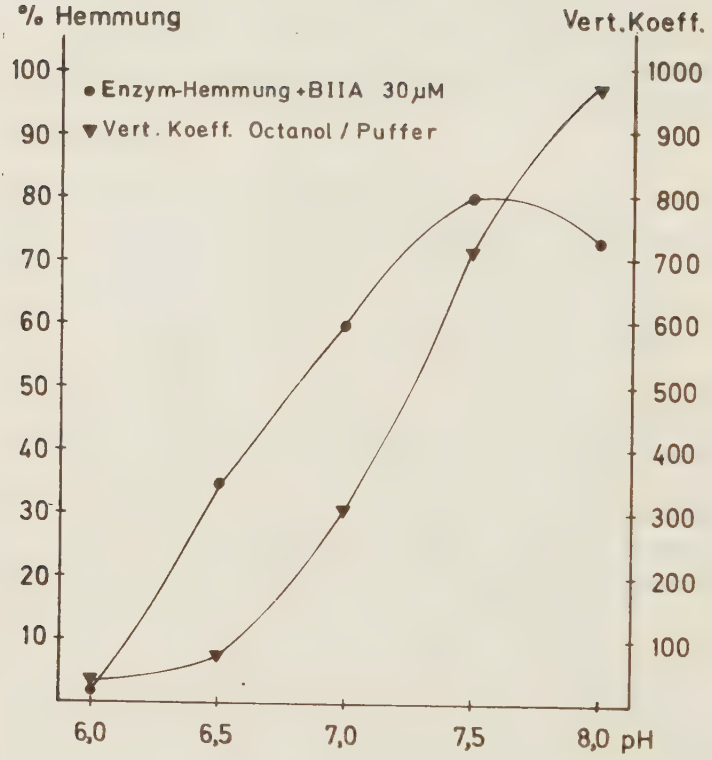


Abb. 11: Korrelation zwischen Lipidlöslichkeit und Wirksamkeit von BIIA auf die Na^+,K^+-ATPase. Der Verteilungskoeffizient bezieht sich auf das System n-Octanol/H_2O (s. Abschn. B.11.).

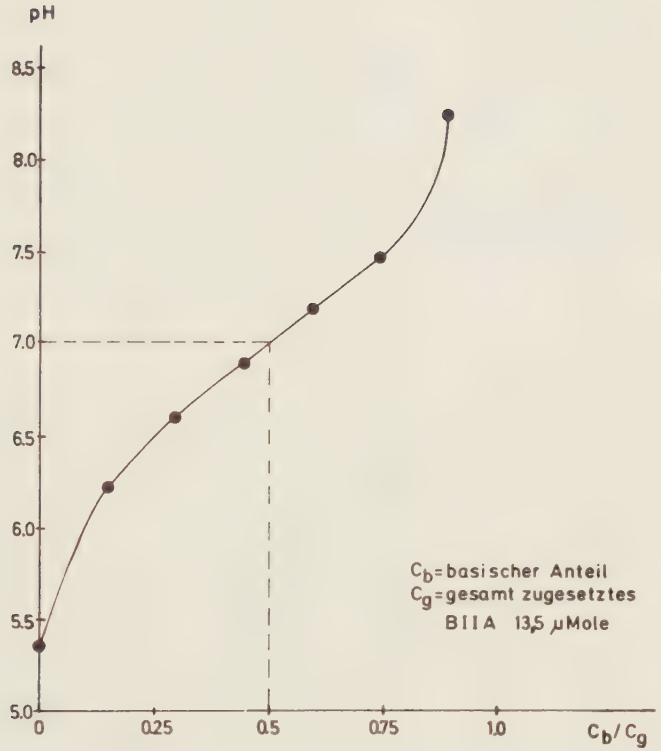


Abb. 12: Titrationskurve für die Bestimmung von K_D für BIIA.

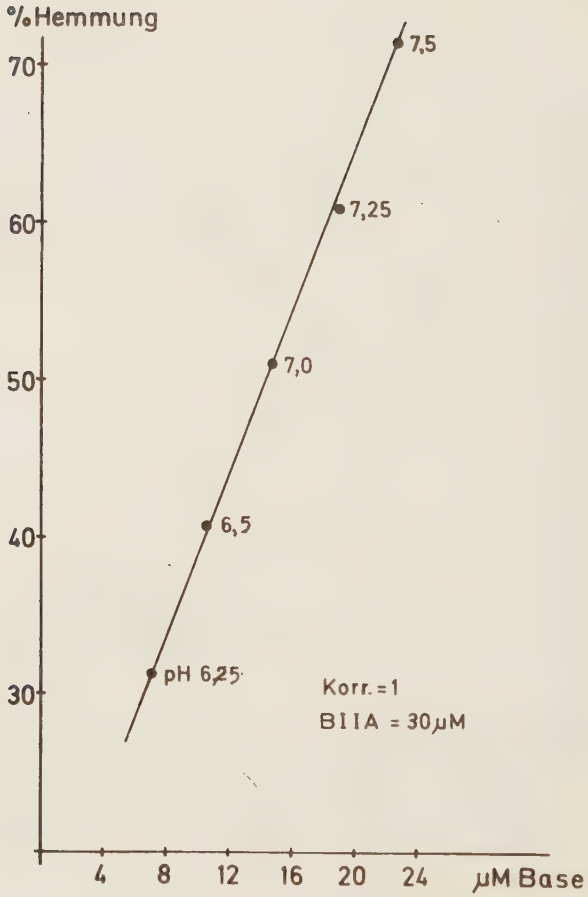


Abb. 13: Korrelation zwischen dem vorhandenen basischen Anteil und der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA.
ID_{50} des wirksamen BIIA Anteils =14,3 µM.

C.7. Einfluß von BIIA auf die Substratbindung.

Die Bindung von ATP an die Na^+,K^+-ATPase wurde in 60 mM Tris-EDTA-Puffer und bei Na^+-Ionenkonzentrationen von 0 - 125 mM mit der in Abschnitt B.8. dieser Arbeit beschriebenen Methode bestimmt, um festzustellen, inwieweit unter den Versuchsbedingungen die gewünschte Substratbindung bzw. eine Phosphorylierung des Enzyms stattfand. Die in Tab. 12 angegebenen Daten zeigen, daß die ATP-Bindung durch Na^+ kaum beeinflußt wird. Bei Konzentrationen oberhalb von 50 mM nimmt die Bindung geringfügig ab.

$[Na^+]$ mM	pM ATP geb./mg Prot.
0	290,7 ± 16.0
12,5	291,7 ± 16.0
25	293.3 ± 17.5
50	296.8 ± 17.5
75	281.5 ± 15.3
100	269.5 ± 15.8
125	252.5 ± 8.2

Tab. 12: Bindung von ATP an die Na^+,K^+-ATPase, Einfluß von Na^+

$n = 4$; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ATP = 2,5 uM

Ferner wurde der dosisabhängige Einfluß von BIIA auf die Bindung von Substrat in Anwesenheit von 0,9 und 2,4 uM ATP untersucht. Die in Abb. 14 dargestellten Ergebnisse zeigen eine dosisabhängige Zunahme des an die Na^+,K^+-ATPase gebundenen ATP. $1{,}26 \times 10^{-3}$M BIIA bewirkten bei einer Konzentration

von 0,9 µM ATP eine 330%ige Zunahme der Substratbindung, während bei 2,4 µM ATP die Bindung um 80 % zunahm.
In Anwesenheit von 5 mM Mg^{++} war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar, wobei die Bindung sogar nur unspezifisch war.
In Anwesenheit von 30 mM Na^{+} war die Wirkung von BIIA auf die ATP-Bindung sehr abgeschwächt: Bei 0,9 µM ATP und 1,29 x 10^{-3} M BIIA nahm die Substratbindung nur um 30 % zu.

In einer ATP-Konzentrationsreihe wurde die Substratbindung an di Na^{+},K^{+}-ATPase in Abwesenheit und Anwesenheit von 64,1 µM BIIA gemessen. Die Konzentration an gebundenen ATP wurden gegen das Verhältnis gebunden / frei in Form einer Scatchardabbildung aufgetragen (Scatchard, 1949). Aus der Steigung der resultierenden Geraden wurde die Dissoziationskonstante für ATP (K_D) und aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse die maximale Zahl der ATP-Bindungsstellen berechnet. Zwei Darstellungen nach Scatchard sind in Abb. 15 wiedergegeben. Aus den Ergebnissen von 12 Versuchen (6 mit und 6 ohne BIIA) wurden die folgenden Werte errechnet. Der K_D-Wert für die ATP-Bindung an die Na^{+},K^{+}-ATPase betrug 2,58 $\pm$ 0,27 uM ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) ohne BIIA und 2,54 $\pm$ 0,18 µM in Anwesenheit von 64,1 µM BIIA. Demnach hat BIIA keinen signifikanten Einfluß auf die Affinität des Enzyms für Substrat, während die maximale Konzentration von ATP-Bindungsstellen unter dem Einfluß von 64,1 µM BIIA von 503 $\pm$ 21 pM/mg Enzymprotein auf 754 $\pm$ 13 zunahm.
Im Gegensatz zu diesen Befunden konnten Hegvary und Post (1971) zeigen, daß durch Vorbehandlung der Na^{+},K^{+}-ATPase mit 1 mM Ouabain die Bindung von Substrat durch eine Abnahme der ATP-Bindungsstellen drastisch vermindert wird, ohne daß die Affinität für das Substrat beeinflußt wird.

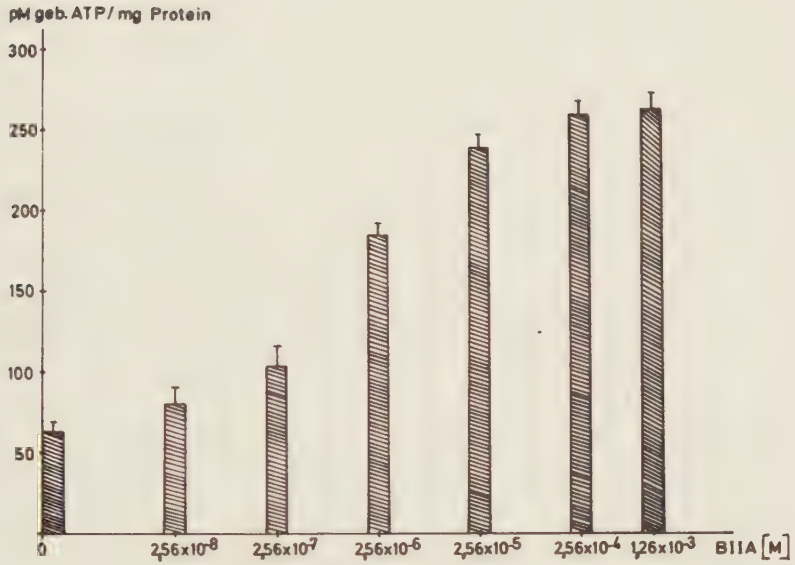


Abb. 14: Einfluß von BIIA auf die Substratbindung an die Na^+,K^+-ATPase.

ATP = 0.9 µM.

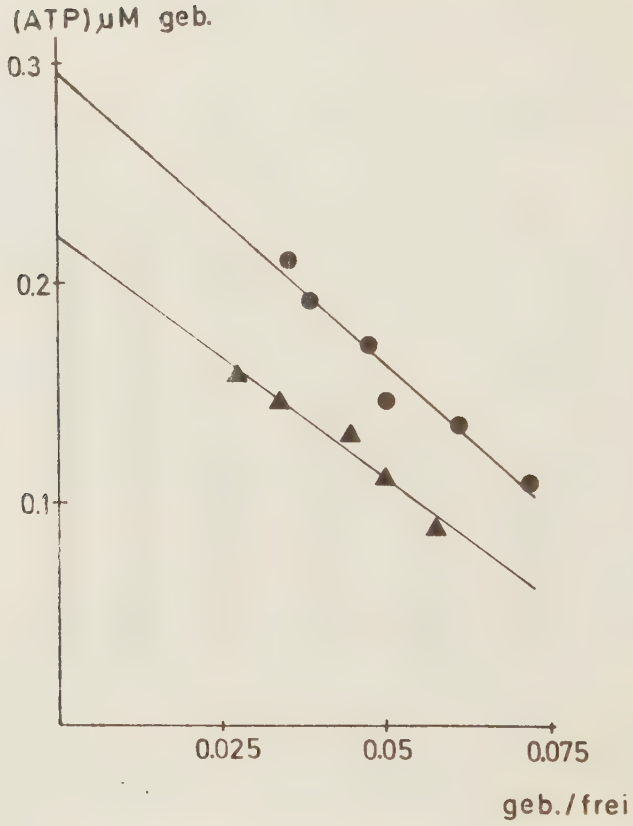


Abb. 15: Scatchard-Abbildung der Substratbindung an die Na^+,K^+-ATPase.

▲ = Kontrolle

● = 64.1 µM BIIA

C.8. Einfluß von BIIA auf die Na^+-abhängige Phosphorylierung

Die Na^+,K^+-ATPase aus Meerschweinchennieren wurde, wie in Abschnitt B.9. beschrieben, 30 s in Anwesenheit von 20 - 140 mM Na^+, 12,5 µM ATP mit und ohne 10 µg/ml Oligomycin phosphoryliert. Als Maß für die Phosphorylierung wurden der Quotient gebundenes PO_4^{3-}/mg Protein berechnet. Die in Abb. 16 graphisch dargestellten Ergebnisse zeigen die Na^+-Abhängigkeit der Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase, die in Abwesenheit von Oligomycin und bei 140 mM Na^+ ein Maximum von 162 pM PO_4^{3-}/mg Protein erreicht und unter Zusatz von 10 µg/ml Oligomycin (eine von Jöbsis und Vreman, 1963, beschriebene Hemmsubstanz der Na^+,K^+-ATPase) bei der gleichen Na^+-Konzentration einen Wert von 608 pM/mg Protein aufweist. Das Enzym war mit KJ vorbehandelt und die K^+-Konzentration betrug in der Enzym-Suspension 130 µM.
NaJ-behandeltes Enzym wurde bei 120 mM Na^+ und 12,5 µM ATP in einem Zeitraum von 5-30 s phosphoryliert. Die in Abb. 17 gezeichneten Werte der Phosphorylierung zeigen nochmal die Oligomycinabhängigkeit. Das NaJ-behandelte Enzym scheint besser phosphoryliert zu werden. Von 5 bis 30 s steigt die Phosphorylierung des Oligomycin-behandelten Enzyms bis zu einem Maximum von 893 pM PO_4/mg Protein stetig an, während die Phosphorylierung des unbehandelten Enzyms von 435 bis 361 pM PO_4^{3-}/mg Protein abnimmt. Innerhalb der ersten 5 s scheint das Oligomycin-behandelte Enzym langsamer phosphoryliert zu werden.

Die Werte betragen 165 pM/mg Protein für das KJ-vorbehandelte gegenüber 435 pM/mg Prot. für das NaJ-behandelte Enzym. Das Enzym wurde unter Zusatz von 0 - 114 µM BIIA, 125 bzw. 12,5 µM ATP und 50 bzw. 120 mM Na^+ phosphoryliert. BIIA hemmt die Na^+-abhängige Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase dosisabhängig.

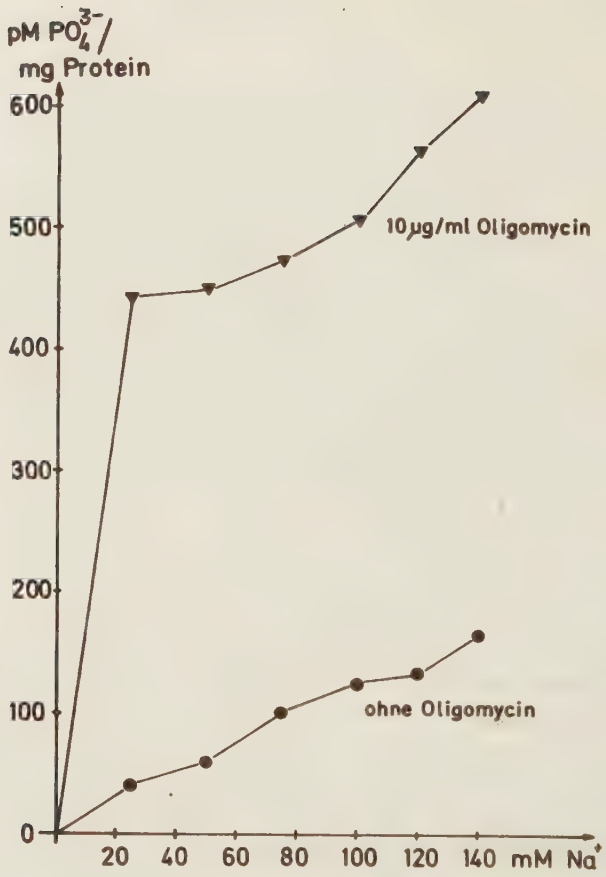


Abb. 16: Die Na^+-abhängige Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase in Abwesenheit und Anwesenheit von Oligomycin. Die Werte sind 30 s nach Inkubationsbeginn gemessen.

Die in Abb. 18 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung des Enzyms sowie die Hemmung der gesamten ATPase Aktivität durch Na^+-Ionen antagonisiert und durch ATP gefördert werden, denn bei zunehmender Na^+-Konzentration (50 bis 120 mM) nahm die Hemmung ab, während sie bei ansteigender ATP-Konzentration (1,25 bis 12,5 µM) zunahm. Bei 120 mM Na^+ betrugen die ID_{50} Werte nach Zusatz von 1,25 µM ATP 1µM und 0,4 µM nach Zusatz von 12,5 µM ATP. Es sei darauf hingewiesen, daß selbst bei 50 mM Na^+ und 10^{-4}M BIIA keine 100%ige Hemmung erreicht wurde. Man kann jedoch die Ergebnisse der Phosphorylierung schlecht mit denen der Hemmung der gesamten Aktivität vergleichen, weil die Phosphorylierungsversuche bei 0^o C und in Abwesenheit von K^+-Ionen durchgeführt worden sind.
Zunächst wurde die Na^+-Konzentration von 25 - 140 mM geändert und das Enzym in Abwesenheit und Anwesenheit von 1,14 und 5,7 µM BIIA und 12,5 µM ATP 10 s phosphoryliert. Für jede BIIA-Konzentration wurden 6 Versuche durchgeführt und die Mittelwerte in zwei Lineweaver-Burk-Abbildungen im Vergleich zur Kontrolle dargestellt (Abb. 19 und 20). Beide Abbildungen entsprechen jeweils den Ergebnissen einer Enzympräparation.

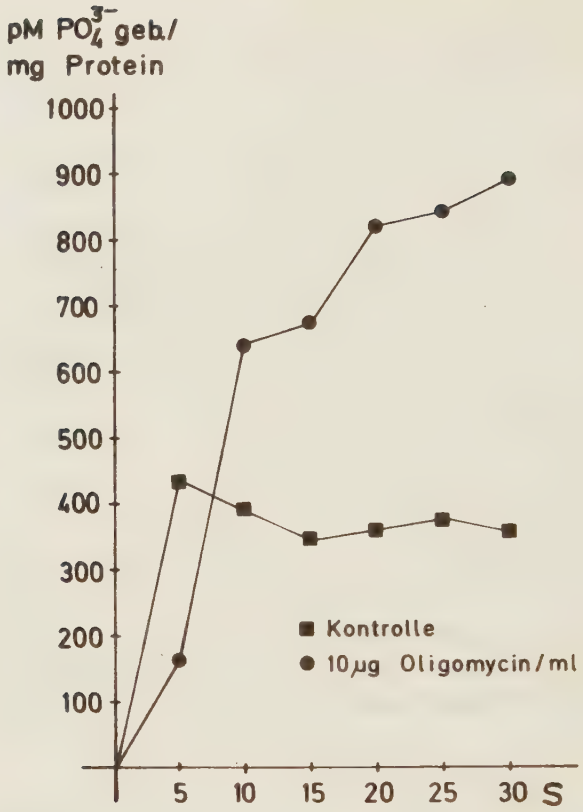


Abb. 17: Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase.

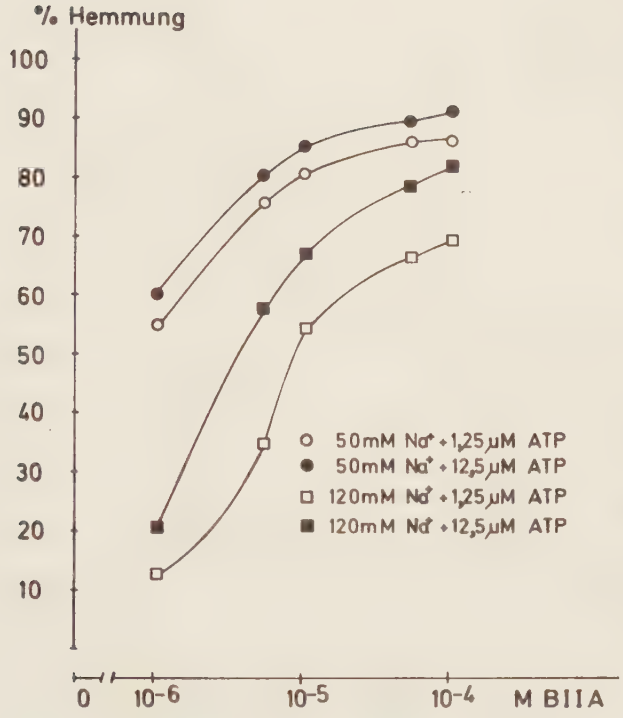


Abb. 13: Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA in Abhängigkeit von Na^+ und Substrat.

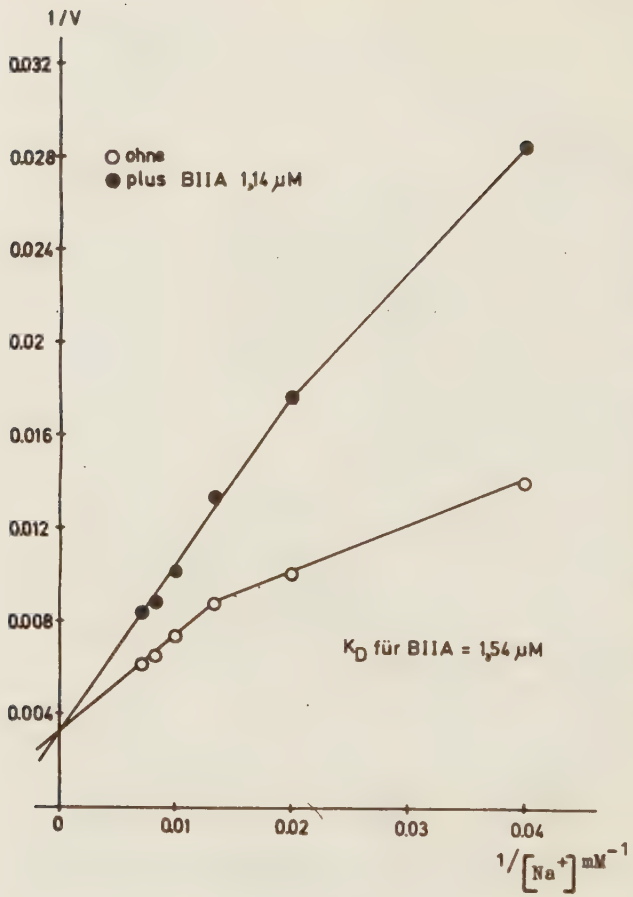


Abb. 19: Na^+-abhängige Hemmung der Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA, dargestellt nach Lineweaver-Burk.

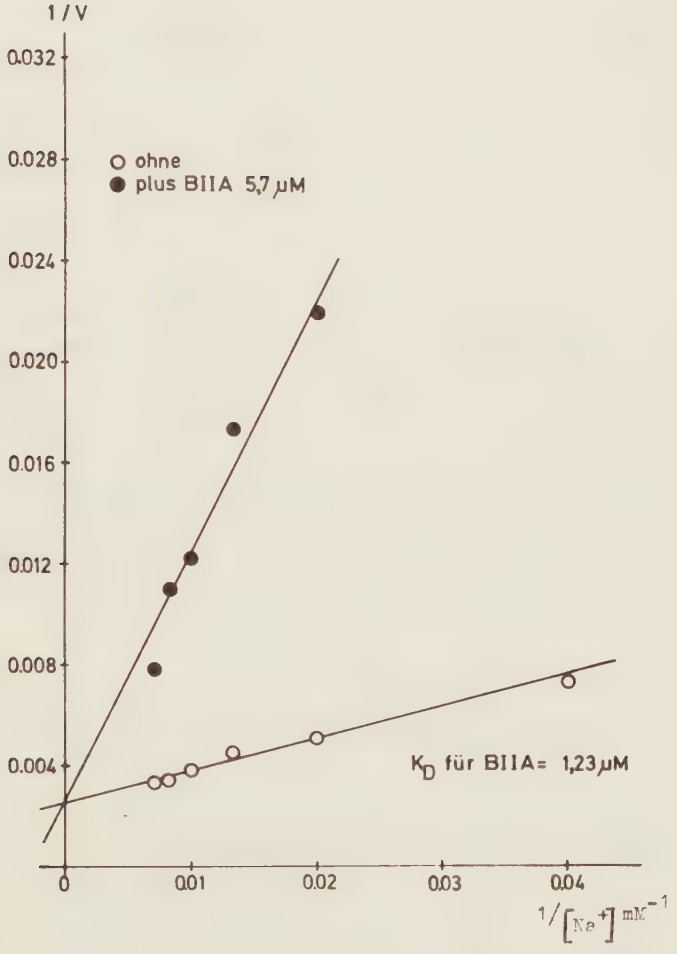


Abb. 20: Na^+-abhängige Hemmung der Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA, dargestellt nach Lineweaver-Burk.

In beiden Abbildungen nimmt der K_m-Wert für Na^+-Ionen ohne Beeinflussung von V_{max} zu, so daß auf eine gegenüber Na^+-Ionen kompetitive Hemmung geschlossen werden kann. Beide Abbildungen entsprechen jeweils den Ergebnissen einer Enzympräparation. In Abb. 19 zeigt der Kurvenverlauf eine Tendenz zur Nichtlinearität, d.h. bei niedrigen Na^+-Konzentrationen nahm die Phosphorylierung im Vergleich zu höheren stärker zu. Es ist anzunehmen, daß die Nichtlinearität von der Enzympräparation abhängt, weil sie in Abb. 19 in den Versuchen mit und ohne BIIA nicht dagegen in Abb. 20 zu sehen ist. Die Dissoziationskonstanten K_D für BIIA in Abb. 19 und 20 betrugen 1,54 µM (für 1,14 µM BIIA) und 1,23 µM (für 5,7 µM BIIA). Die Na^+-abhängige Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase wurde für verschiedene BIIA-Konzentrationen (0 - 114 µM) in Anwesenheit von 50 oder 120 mM Na^+ mit und ohne 10 µg/ml Oligomycin durchgeführt. Die in Tab. 13 aufgeführten Ergebnisse zeigen eine dosisabhängige Hemmung der Phosphorylierung durch BIIA. Diese Hemmung wurde sowohl durch Na^+-Ionen wie auch durch Oligomycin antagonisiert. 10 µg/ml Oligomycin bewirkten eine 30 - 40%ige Abnahme des Hemmeffektes durch BIIA.

(BIIA) µM	50 mM Na^+	50 mM Na^+ 10 µg/ml Oligomycin	120 mM Na^+	120 mM Na^+ 10 µg/ml Oligomycin
114	95,2 ± 1,6	75,6 ± 3,8	83,4 ± 2,7	57,8 ± 0,8
57	90,4 ± 3,5	64,1 ± 2,1	80,8 ± 1,9	48,6 ± 3,2
11,4	74,4 ± 2,4	43,7 ± 2,4	73,6 ± 3,2	23,7 ± 2,2
5,7	59,8 ± 2,7	33,9 ± 1,8	68,8 ± 4,5	13,8 ± 1,7
1,14	44,8 ± 1,6	14,9 ± 0,9	35,3 ± 2,5	9,9 ± 1,1

Tab. 13: Prozentuale Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung durch BIIA unter dem Einfluß von Oligomycin. (ATP) = 12,5 µM; n = 4 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Von diesen Versuchen wurden Abbildungen nach Dixon (Abb. 21 und 22) hergestellt, wobei die reziproke Geschwindigkeit gegen die BIIA Konzentration aufgetragen wurde. Die Kurven in Abb. 21 und 22 verlaufen nicht linear, d.h. mit zunehmender BIIA-Konzentration nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit in ständig geringerem Ausmaß ab, K_I für BIIA nahm unter Zusatz von 10 µg/ml Oligomycin von 1,7 auf 4 µM zu. Demnach nimmt die Affinität des Enzyms für BIIA während der Na^+-abhängigen Phosphorylierungsschritte in Anwesenheit von Oligomycin ab.

Zunächst wurde die Na^+-abhängige Phosphorylierung und die Aktivität der Na^+,K^+-ATPase nach Behandlung mit N-Äthylmaleimid (NEM) untersucht. Die Vorbehandlung mit NEM wurde in Teil B.9. dieser Arbeit beschrieben. Die Wirkung von NEM auf das Enzym ist in Tab. 14 zusammengefaßt.

(NEM) mM	% Hemmung der Na^+,K^+-ATPase	% Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung
10	100	76,20 ± 3,23
7,5	100	70,83 ± 2,02
5	93,59 ± 0,76	43,07 ± 2,32
1	68,37 ± 5,65	+ 3,55 ± 1,03
0,1	9,39 ± 7,10	+ 27,11 ± 9,28

Tab. 14: Hemmung der Aktivität der Na^+,K^+-ATPase und der Na^+-abhängigen Phosphorylierung durch NEM.
$n = 6$; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Während eine vollständige Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch NEM zu beobachten ist, wird die Na^+-abhängige Phosphorylierung nur teilweise gehemmt. Es sei hier nochmals hervorgehoben, daß die ATPase-Aktivität und die Phosphorylierung unter

ganz unterschiedlichen Bedingungen gemessen wurden, jedoch mit einem Enzym, daß mit NEM gleichartig vorbehandelt wurde. Um festzustellen, ob eine Vorbehandlung mit NEM einen Effekt auf die Wirksamkeit von BIIA hatte, wurden das Enzym mit und ohne 5 mM NEM in Anwesenheit von ATP und unter Zusatz von 0 - 114 µM BIIA phosphoryliert.

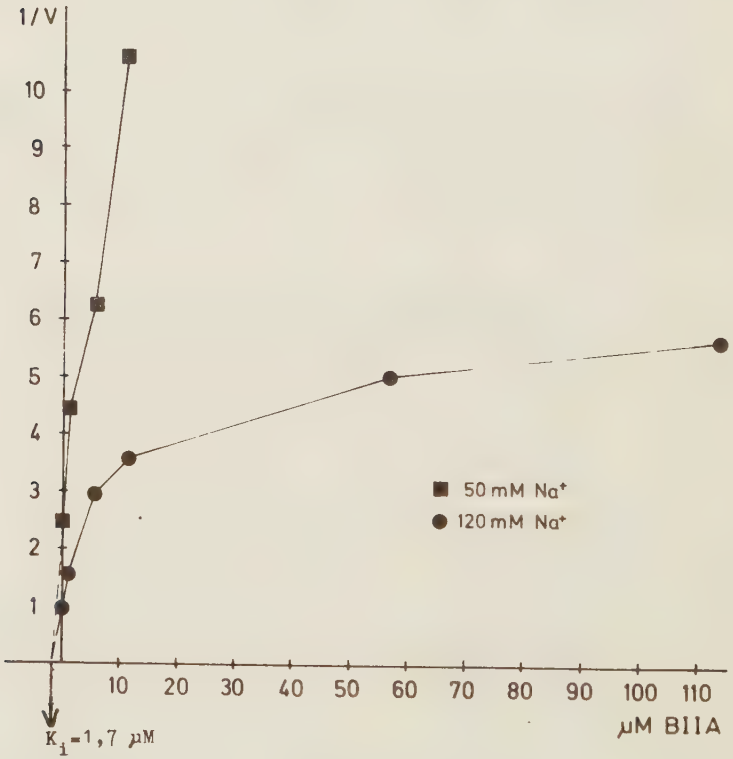


Abb. 21: Darstellung nach Dixon der Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung durch BIIA in Abhängigkeit von Na^+.

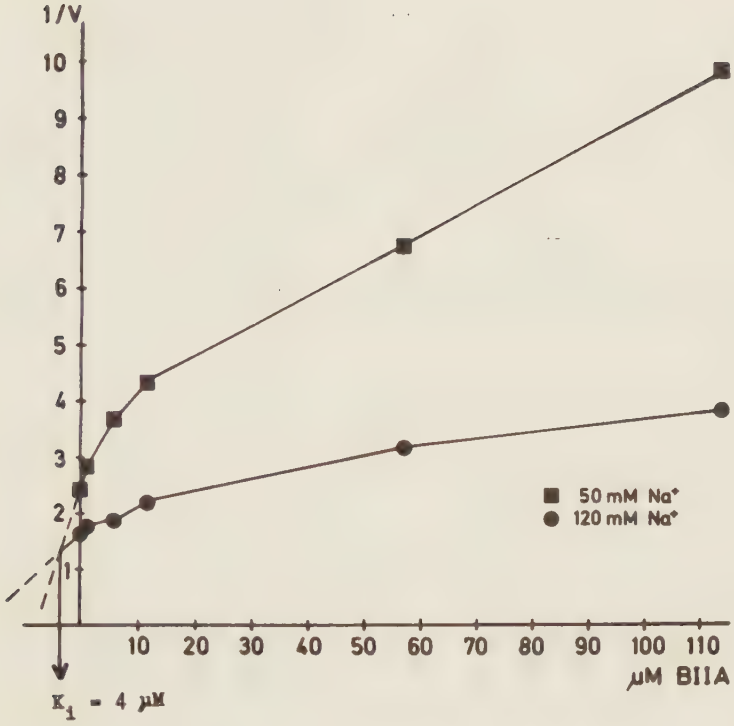


Abb. 22: Darstellung nach Dixon der Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung durch BIIA in Abhängigkeit von Na^+ und in Anwesenheit von 10 µg/ml Oligomycin.

(BIIA) µM	% Hemmung	% Hemmung vorbehandelt
114	88,22 ± 0,82	71,66 ± 4,52
57	84,70 ± 0,59	76,99 ± 1,54
11,4	72,39 ± 0,34	33,06 ± 5,91
5,7	67,70 ± 7,36	22,85 ± 0,21
1,14	37,62 ± 6,23	11,74 ± 2,79

Tab. 15: Effekt von NEM auf die Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung durch BIIA.
$[Na^+]$ = 100 mM, $[ATP]$ = 2,5 µM, mit 5 mM NEM vorbehandelt.
$n = 6$, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Die in Tab. 15 aufgeführten Ergebnisse zeigen eine Abnahme der Wirksamkeit von BIIA auf die Phosphorylierung nach NEM-Vorbehandlung. In diesen Versuchen wurde eine 68 %ige Hemmung der Phosphorylierung durch Vorbehandlung mit 5 mM NEM beobachtet, wobei zu berücksichtigen bleibt, daß die Enzympräparationen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber NEM zeigten.
Skou und Hilberg (1969) haben die Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase von ^{32}P-ATP unter Zusatz von 120 mM Na^+ 3 mM Mg^{++} und Ouabain untersucht. Erst bei 1 µM Ouabain ($\hat{=}$ ID_{50} für die Enzymaktivität) trat eine Hemmung auf, die bei 1 mM Ouabain 50 % nicht überschritt. In eigenen Versuchen wurde unter anderen Versuchsbedingungen eine 35%ige Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung durch 0,2 mM Ouabain gemessen.

C.9. Einfluß von BIIA auf die spontane K^+- und ADP-abhängige Phosphorylierung

Die entweder mit 5 mM NEM oder 10 µg/ml Oligomycin vorbehandelte ATPase wurde dephosphoryliert, um die Änderung des BIIA-Einflusses auf das Phosphoenzym durch NEM und Oligomycin näher zu untersuchen.
Das Enzym wurde 10 s phosphoryliert, nach Zugabe von 0,2 M ATP, 10 mM KCl oder 250 µM ADP 10 s dephosphoryliert und die prozentuale Dephosphorylierung berechnet. Einige Proben wurden nach dem Phosphorylierungsschritt direkt gemessen und als Kontrolle verwendet.

Art der Dephosphorylierung	% Dephosphoryliert Kontrolle	+ NEM	% Dephosphoryliert Kontrolle	+ Oligomycin
ATP (0,2 M)	82,9 ± 2,5	49,7 ± 0,6	85,6 ± 0,4	52,1 ± 7,5
KCl (10 mM)	83,0 ± 2,6	12,6 ± 4,5	86,4 ± 2,1	26,5 ± 9,9
ADP (250 uM)	75,0 ± 1,2	70,3 ± 5,2	72,7 ± 2,8	87,4 ± 2,2

Tab. 14: Effekte von NEM und Oligomycin auf die Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase.

$n = 6$; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Die Ergebnisse sind in Tab. 14 zusammengefaßt. Die bei einem ATP-Überschuß gemessene Dephosphorylierung des Enzymphosphatkomplexes nahm unter Zusatz von NEM oder Oligomycin ab, d.h. die spontane Dephosphorylierung nahm in beiden Fällen ab und somit die Stabilität zu.

Die K^+-abhängige Dephosphorylierung wurde noch stärker beeinflußt, denn nach Behandlung mit Oligomycin und NEM ist das Enzym relativ K^+-unempfindlich geworden. Nach Vorbehandlung mit Oligomycin nahm die Dephosphorylierung 60 % und mit NEM 70 % ab.

Die ADP-abhängige Dephosphorylierung wurde weniger stark beeinflußt. Durch Oligomycin wurde das Enzym ADP-empfindlicher und die Dephosphorylierung nahm um 15 % zu, während NEM diesen Schritt nicht signifikant veränderte.
Ferner wurde das Enzym phosphoryliert und in Anwesenheit von 0,2 M ATP oder 10 mM KCl, in An- und Abwesenheit von 5,7 µM BIIA dephosphoryliert. Das Enzym wurde weiterhin unter Zusatz von 0,2 mM Ouabain phosphoryliert und, wie oben beschrieben, wieder dephosphoryliert.

	pM PO_4/mg Protein	% Dephosphoryliert
Kontrolle	298,4 ± 2,0	-
ATP (0,2 M)	113,0 ± 21,1	62,1 ± 11,6
ATP + BIIA (5,7 uM)	122,6 ± 16,2	58,9 ± 7,8
KCl (10 mM)	22,2 ± 4,2	92,6 ± 5,3
KCl (10 mM) + BIIA (5,7 µM)	21,1 ± 1,1	92,9 ± 2,4
Phosphoryliert + 0,2 mM Ouabain	194,1 ± 10,3	-
+ ATP (0,2 m)	119,9 ± 14,6	59,8 ± 7,3
+ KCl (10 mM)	138,7 ± 5,3	28,5 ± 1,1

Tab. 15: Effekte von BIIA und Ouabain auf die Dephosphorylierung

$n = 6$; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Die in Tab. 15 angegebenen Ergebnisse zeigen weder einen signifikanten Einfluß von BIIA auf die spontane- noch auf die K^+-abhängige Phosphorylierung.
0,2 mM Ouabain bewirkte eine 35 %ige Abnahme der Phosphorylierung. Die spontane Dephosphorylierung wurde nicht beeinflußt, jedoch nahm die K^+-abhängige Dephosphorylierung von 92,6 auf 28,5 % ab.

Abschließend wurde das Enzym in Anwesenheit von Oligomycin mit und ohne 5,7 µM BIIA mit 250 µM ADP dephosphoryliert. Das Kontrollenzym wurde zu 87,9 ± 3,4 % dephosphoryliert, das BIIA-behandelte Enzym zu 87,5 ± 5,2 %, d.h. es wurden keine signifikante Unterschiede festgestellt.

Sen und Tobin (1969) untersuchten den Einfluß von Ouabain auf die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase. Die folgenden Effekte wurden beschrieben:

1) Ouabain hemmt die Phosphorylierung des Enzyms, Dieser Effekt wurde durch Mg^{++}-Ionen gefördert und durch Na^+-Ionen aufgehoben. 2) Das Phosphoenzym wurde durch Ouabain stabilisiert und 3) durch K^+-Ionen langsamer dephosphoryliert. Die oben beschriebenen Versuche stehen mit den Punkten 1) und 3) in Einklang, während die bei ATP-Überschuß gemessene Stabilität des Phosphoenzyms nicht zunahm und insofern nicht mit Punkt 2) übereinstimmt.

Hegyvary (1976) hat Versuche zur Empfindlichkeit des ADP-sensiblen-Enzyms gegenüber Ouabain durchgeführt. Es wurde festgestellt, daß NEM-vorbehandeltes Enzym in phosphorylierter Form Ouabain bindet und dadurch eine stabilisierte Form des Enzyms mit entsprechender Reduktion der ADP-Empfindlichkeit herbeiführt.

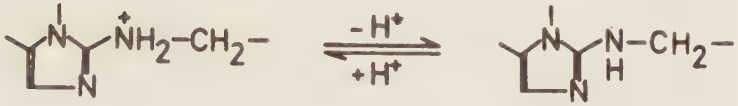
Diskussion

Zur Bestimmung der Aktivität der Na^+,K^+-ATPase erwies sich die gekoppelte spektrofotometrische Nachweismethode als besonders günstig. Sie gewährleistet eine konstante Substratkonzentration bei fehlender Endproduktthemmung und ermöglicht eine fortlaufende Beobachtung der Enzymreaktion über einen längeren Zeitraum. Die Messung der Freisetzung von anorganischem Phosphat erwies sich aus folgenden Gründen als ungünstiger: Die Methode ist zeitaufwendiger; der Phosphat-Anteil, der durch Hydrolyse von ATP im sauren Milieu entsteht, wird zusammen mit der Phosphatmenge gemessen, die durch das Enzym freigesetzt wird. Die spezifischen Aktivitäten sind geringer als die Werte, die mit der spektrofotometrischen Methode erhalten werden.

Die mit der spektrofotometrischen Methode bestimmten Aktivitäten der Na^+,K^+-ATPase korrelierten gut mit den Aktivitäten, die von Akera (1969) und Nakao (1965) gemessen wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Präparationsmethode der genannten Autoren verwendet. Die Aktivität war vom Ursprungsort des Gewebes abhängig.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß BIIA ein stark wirksamer Hemmstoff der Na^+,K^+-ATPase ist. Die Wirkungsstärke von BIIA ist jedoch ca. 20 mal geringer als die von Ouabain (Vergleich der ID_{50}). Dennoch kann man unter veränderten Ionenbedingungen, die von den optimalen Bedingungen für die Na^+,K^+-ATPase abweichen, wie z.B. bei niedrigem Na^+ und hohem pH-Wert, eine ID_{50} für BIIA in der Größenordnung von 10^{-6} M erhalten, im Gegensatz zu den Werten in der Größenordnung von 10^{-5} M, die unter Bedingungen gemessen wurden, unter denen in vitro eine maximale Aktivierung des Enzyms erfolgt.

Für die Hemmwirkung von BIIA ist die basische Form des Moleküls verantwortlich. Ihre Konzentration ist vom pH-Wert des Mediums abhängig. Mit Hilfe der Dissoziationskonstanten K_D für BIIA von 7,01 bei pH 7,4 beträgt der basische Anteil 70 % der gesamten Substanzkonzentration. Für BIIA läßt sich in Abhängigkeit von pH-Wert folgendes Gleichgewicht formulieren:



A B

Das Molekül B scheint für die hemmende Wirkung auf die ATPase verantwortlich zu sein. Aus der Zunahme des Verteilungskoeffizienten für BIIA zwischen n-Octanol und Wasser mit zunehmendem pH-Wert ergibt sich, daß die aktive Form lipophil ist und eine niedrige Löslichkeit in Wasser besitzt. Die Lipophilie dürfte eine wichtige Rolle dafür spielen, daß das große Molekül den Rezeptor am Enzymkomplex in Gegenwart einer hohen

Phospholipidkonzentration erreicht. Für das aktive Molekül existiert ein Gleichgewicht zwischen mesomeren Grenzstrukturen, die für die kompetitive Bindung BIIA und Na^+ an die Bindungsstellen der Na^+,K^+-ATPase von Interesse sein dürften:

Einige Gesichtspunkte lassen darauf schließen, daß sich der Rezeptor am Na^+,K^+-ATPase Molekül für BIIA von dem für Herzglykoside unterscheidet. Zunächst dürfte die vollständig andere Molekülstruktur eine Rolle spielen. Für die hohe Affinität und maximale Hemmung benötigt das Herzglykosid nach Erdmann und Schoner (1974) einen ungesättigten Lactonring, ein Steroidgerüst und eine Zuckerkomponete. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Sättigung des Lactonrings, wie sie in den Dihydrometaboliten vorliegt, die Wirksamkeit der Glykoside als Hemmstoffe der Na^+,K^+-ATPase reduziert.

Ein weiterer Unterschied zwischen BIIA und Herzglykosiden beruht darauf, daß die Na^+,K^+-ATPase aus Rattenherz, ein Enzym, das relativ unempfindlich gegenüber Herzglykosiden ist (Repke, 1965) durch BIIA in gleichem Ausmaß gehemmt wird wie Enzyme, z.B. aus Herz und Hirn des Meerschweinchens, die gegen Herzglykoside empfindlich sind.

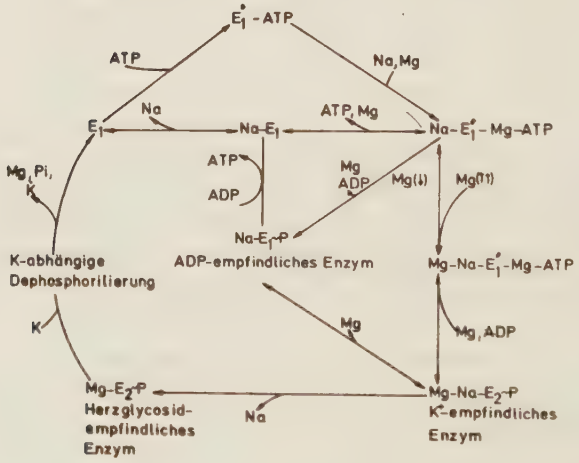
Die Bindung der Herzglykoside an ihre Rezeptoren ist ein zeitabhängiger Vorgang, der von den Inkubationsbedingungen abhängt und für die Erreichung des Gleichgewichtes zwischen 15 min und 1 Std. erfordert (Allen und Schwartz, 1970; Erdmann und Schoner, 1973). Im Gegensatz hierzu konnte die volle Hemmwirkung von BIIA bereits nach einminütiger Präinkubation beobachtet werden, ohne daß die Anwesenheit bestimmter Ionen im Präinkubationsmedium notwendig war. Die sehr hohe Lipidlöslichkeit des für die Hemmwirkung verantwortlichen basischen BIIA-Anteils könnte insofern von Bedeutung sein, als sie eine rasche Diffusion des großen Moleküls an die Wirkstelle ermöglicht. 1968 beobachteten Albers et al., daß Digitoxin und Scillarin A eine schneller einsetzende Hemmung der Na^+,K^+-ATPase bewirken als Ouabain und Digoxin. Sie zogen hieraus den Schluß, daß die Geschwindigkeit der Wechselwirkung zwischen Herzglykosiden und dem Transportenzym umgekehrt proportional zur Zahl der Hydroxyl- und Zuckergruppen ist und von der Lipophilie abhängig ist. Die für das neutrale lipophile Polidocanol beobachtete schwache unspezifische Hemmung der Na^+,K^+-ATPase läßt sich möglicherweise auf eine Interaktion mit der Phospholipidphase des Enzyms zurückführen. Diese Überlegung könnte ebenfalls zur Erklärung der geringfügigen unspezifischen Hemmung der Mg^{++}-aktivierten ATPase durch BIIA herangezogen werden.

Die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA erwies sich in den Verdünnungsversuchen innerhalb einer halben Stunde als 100 %ig reversibel, so daß irreversible Veränderungen der Enzymstruktur, manchmal Inaktivierung genannt, ausscheiden. Im Gegensatz hierzu ist die durch Ouabain hervorgerufene Hemmung nur teilweise reversibel. Yoda und Hokin (1970) führten eine sorgfältige Analyse der Hemmung durch Herzglykoside durch. Sie entdeckten, daß die Substitution in C_3 des Aglykons mit einem Zuckerrest für die Irreversibilität der Hemmung verantwortlich ist.

Die Beobachtung, daß die Interaktion von BIIA mit der Na^+,K^+-ATPase nicht die Aktivierungsenergie des Enzyms veränderte, spricht dafür, daß die Hemmung vorwiegend durch physikalisch-chemische Prozesse und nicht durch chemische Reaktionen gesteuert wird. Dies ist in Einklang mit der Reversibilität der Hemmung und wird durch die Hypothese von Warshel (1978) gestützt, daß die enzymatische Aktivität in erster Linie durch elektrostatische Stabilisierung iononogener Übergangszustände hervorgerufen wird. Die Fähigkeit von BIIA und Herzglykosiden, eine vollständige Hemmung der Na^+,K^+-ATPase zu bewirken, beruht vermutlich auf Bildung eines Komplexes, der durch Bindung an das ATPase-Molekül zustande kommt und zum Verlust seiner katalytischen Eigenschaften führt.

Entsprechend der Wirkung von Substrat- und Aktivator-Ionen auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA läßt sich ein Modell für die Reaktionsweise und den Wirkort von BIIA aufstellen, das in Abb. 23 schematisch dargestellt ist.

Hypothetischer Ablauf der Na-K-ATPase-Reaktion



Ein erster Anhaltspunkt für den Wirkmechanismus von BIIA ergibt sich aus der gegenüber ATP unkompetitiven Hemmung. Eine unkompetitive Hemmung setzt im allgemeinen eine Bindung des Hemmstoffes an den Enzym-Substrat-Komplex voraus (Webb, 1963). Es läßt sich daher annehmen, daß der ATP-Bindung eine Konformationsänderung folgt, die die Interaktion von BIIA mit dem Enzym erleichtert. BIIA könnte sich daher mit dem Komplex E_1^*-ATP verbinden (s. Abb. 23). E_1^* symbolisiert im Gegensatz zu E_1 den Wechsel im Energiezustand des Enzyms, der durch ATP bewirkt wird und als vorangehender Schritt für den nachfolgenden Konformationswechsel E_1-E_2 notwendig ist. Bis zu dieser Stufe ähnelt die Hemmung durch BIIA der von Flupenthixol, einem Thiaxanthenderivat, bzw. seinem phenothiazinanalogen Fluphenazin (Palatini, 1977 a), wenngleich die ID_{50}-Werte für diese Substanz höher waren, nämlich 80 bzw. 160 µM. Aus der pH-Abhängigkeit geht hervor, daß beide Pharmaka in der unprotonierten lipophilen Form wirksamer sind. Palatini fand ebenfalls eine unkompetitive Bindung gegenüber ATP, jedoch wurde das Mg/ATP-Konzentrationsverhältnis so geändert, daß es ständig 1 betrug. ATP alleine wurde nicht verwendet. Da Mg^{++} keinen Effekt auf die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA hat, erweist sich die Hypothese von Skou (1965) als fragwürdig, Mg.ATP sei das einzige "reine" Substrat für das Enzym. Denn die Steigerung der Hemmwirkung von BIIA durch ATP ist unabhängig von der Mg^{++}-Konzentration. Ferner stellten wir in Übereinstimmung mit Hegyvary und Post (1971) fest, daß eine sehr starke ATP-Bindung auch in vollständiger Abwesenheit von Mg^{++} und Anwesenheit von EDTA auftritt. In Anwesenheit von Na^+ bewirkt BIIA eine Zunahme der ATP-Bindung an das Enzym, wahrscheinlich durch Zunahme der Zahl der Bindungsstellen. Dieser Effekt verschwindet bei 30 mM Na^+, so daß er für die BIIA-Wirkung unter physiologischen Ionenbedingungen keine Rolle spielen dürfte.

Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, daß sich die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA kompetitiv gegenüber Na^+

erweist. Im Gegensatz zu anderen Substanzen ist die Hemmung in einem großen Konzentrationsbereich sowohl für BIIA wie auch für Na^+ kompetitiv, wie sich aus den Dixon- und Lineweaver-Burk-Darstellungen ergibt (s. Abb. 6 und 7). Eine kompetitive Hemmung bedeutet, daß BIIA und Na^+ entweder um dieselben Enzym-Bindungsstellen konkurrieren oder daß beide eigene Bindungsstellen besitzen und die Bindung von Na^+ die Bindung von BIIA, möglicherweise durch allosterische Hinderung, ausschließt und umgekehrt. Canessa et al. (1973) berichteten, daß die Harmala-Alkaloide die Na^+,K^+-ATPase kompetitiv gegenüber Na^+ hemmen. Robinson (1975) stellte jedoch fest, daß bei höheren Na^+-Konzentrationen die Hemmung nicht verschwand und daß der V_{max}-Wert durch Harmalin abnahm. Die V_{max}-Abnahme wurde als gleichzeitige Abnahme der Affinität des Enzyms für K^+ gedeutet. Robinson wies daher auf die Abnahme sowohl der Na^+- wie auch der K^+-Affinität hin. Ähnliche Ergebnisse erzielte Palatini (1977) bei der Untersuchung der oben erwähnten trizyklischen Antidepressiva. Er beobachtete eine kompetitive Hemmung sowohl gegenüber Na^+ wie auch K^+, die bei ansteigender Ionenkonzentration nichtkompetitiv wurde. Dies bleibt zu erwarten, wenn die Konzentrationserhöhung eines Ions nicht die Aktivierungshemmung durch das andere Ion beseitigen kann. BIIA jedoch verändert die Affinität des Enzyms für Na^+ ohne Änderung von V_{max}. Dies weist auf eine sehr spezifische Interaktion mit den Na^+-Bindungsstellen hin.

Die zunehmende Hemmwirkung von BIIA mit zunehmendem pH wird nicht durch eine pH-abhängige Affinitätsänderung der Na^+-Bindungsstellen verursacht. Denn Robinson (1977) hat gezeigt, daß $K_{0.5}$ für Na^+ sich im pH-Bereich von 6-8 nicht ändert. Zunehmende K^+-Konzentration erhöht die Affinität des Enzyms für BIIA und führt auf diese Weise zur Abnahme der ID_{50}. Dies könnte durch eine Zunahme der E_1-Konzentration infolge eines Anstiegs der K^+-abhängigen Dephosphorylierung bewirkt werden. Dadurch könnten mehr ATP und BIIA an das Enzym gebunden und eine stärkere Hemmung herbeigeführt werden. Aus Abb. 8 ist zu ersehen, daß zunehmende K^+- Konzentrationen die

Hemmwirkung von BIIA in einem großen Na^+-Konzentrationsbereich verstärkt. Der K^+-Einfluß auf die Hemmung durch BIIA läßt sich ebenfalls damit erklären, daß die Zunahme von K^+ die Affinität des Enzyms für Na^+ senkt. Ein derartiger Effekt wurde von Robinson (1977) beschrieben. Die Abnahme der Na^+-Affinität könnte zur verstärkten BIIA-Bindung an das Enzym und damit zur Abnahme der ID_{50} führen. Eine Erklärung hierfür wäre eine allosterische Interaktion zwischen Na^+- und K^+-Bindungsstellen und/oder eine Konkurrenz zwischen K^+ und Na^+-Bindungsstellen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß BIIA die Na^+-abhängige Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase hemmt. Es besteht insofern eine Ähnlichkeit zu der Hemmung der Gesamtaktivität, als dieser Effekt kompetitiv gegenüber Na^+ ist und durch ansteigende ATP-Konzentrationen verstärkt wird. Die ID_{50}-Werte für die Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung waren 2 bis 5 mal niedriger als die Werte für die Hemmung der Gesamtaktivität. Ein Vergleich dieser Werte ist wegen der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen bei der Messung der jeweiligen Aktivität nur bedingt möglich. Jedoch deuten die niedrigen ID_{50}-Werte für die Na^+-abhängige Phosphorylierung darauf hin, das BIIA an dieser Teilreaktion der ATPase angreift. Die aus den entsprechenden Lineweaver-Burk-Darstellungen berechneten Dissoziationskonstanten für BIIA (1,54 und 1,23 µM in K^+-freiem Medium) sind mit den Werten vergleichbar, die unter geeigneten Bedingungen für die Bindung an das Gesamtenzym berechnet wurden (1,64 µM bei 15 mM K^+). Das die Hemmung der Phosphorylierung nicht 100 % erreicht, kann an den niedrigen ATP-Konzentrationen und der Abwesenheit von K^+ gelegen haben, beides Faktoren, die die Hemmung der Aktivität des Gesamtenzyms verstärken. Schoot (1977) verwendete eine gereinigte Na^+,K^+-ATPase aus Mikrosomen der äußeren Kaninchenmedulla, die durch Extraktion mit Dodecylsulfat und kontinuierliche Dichtegradienzentrifugation in Saccharose nach der Beschreibung von Jørgensen (1974 a) gewonnen wurde.

Er fand nach der Behandlung mit NEM parallel zur Hemmung der Gesamtaktivität eine Hemmung von Teilreaktionen des Enzyms. Als Erklärung für die fehlende Übereinstimmung zwischen der Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung und der Hemmung der Gesamtaktivität durch NEM, wie sie von Fahn et al. (1966) sowie in der vorliegenden Arbeit für BIIA beschrieben wurde, nimmt Schoot einen unzureichenden Reinheitsgrad der Präparation und damit eine Phosphorylierung von anderen Proteinen an, die das verwendete ATP verunreinigen. Zwar könnte dies eine Erklärung für die unvollständige Hemmung der Phosphorylierung durch BIIA sein, doch wurde die unspezifische Phosphorylierung immer von der Gesamtphosphorylierung abgezogen. Als unspezifische Phosphorylierung wurde der Anteil gemessen, der einer Dephosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase in Gegenwart einer hohen K^+-Konzentration entsprach. Es wurde vermutet, daß eine relativ unreine ATPasepräparation eine geringere Verfügbarkeit der aktiven Gruppen aufweist, die für die Interaktion des Hemmstoffes mit dem Enzym wichtig sind. Dies könnte für die Hemmung der ATPase mit NEM zutreffen. Für BIIA dagegen ließen sich diese reaktiven Gruppen durch K^+ und/oder ansteigendes ATP demaskieren.

Die nichtlinearen Dixon-Darstellungen in Abb. 21 und 22 zeigen, daß die Hemmung der Na^+-abhängigen Phosphorylierung des Enzyms nicht proportional zur BIIA-Konzentration ist. Dies könnte auf einer zusätzlichen Bindung oder Anreicherung von BIIA, z.B. in der Phospholipidphase des Enzyms, beruhen, die nicht mit der Wirkung auf die Na^+-abhängige Phosphorylierung, wohl jedoch mit der Hemmung der Gesamtaktivität in Zusammenhang steht (siehe lineare Dixon-Darstellung in Abb. 7).
Oligomycin vermindert die Wirkung von BIIA auf die Na^+-abhängige Dephosphorylierung. Dies ist möglicherweise auf eine Abnahme der Enzymaffinität für BIIA zurückzuführen. Hierfür spricht die aus Abb. 21 und 22 errechnete Zunahme der

Dissoziationskonstanten von 1,7 auf 4 µM in Anwesenheit von Oligomycin. Oligomycin stabilisiert die E_1-P-Form des Enzyms, so daß die Phosphorylierung zunimmt und die spontane und K^+-abhängige Dephophorylierung abnehmen. Diese stabilisierte E_1-P-Form kann sich nach Oligomycingabe anhäufen, wodurch das Enzym deutlich unempfindlicher gegenüber BIIA wird.

Auch NEM hemmt zusätzlich zu seiner Wirkung auf die Gesamtaktivität des Enzyms und auf die Phosphorylierungsreaktion sowohl die K^+-abhängige wie auch die spontane Dephosphorylierung. Dies entspricht den Ergebnissen von Schoot et al. (1977), daß die Hemmung der Gesamtreaktion die Summe der Hemmung der Teilreaktion ist. Die Wirksamkeit von BIIA auf das mit NEM vorbehandelte Enzym nahm ebenfalls ab, wahrscheinlich durch Abnahme der BIIA-Bindung an das Enzym und durch Anhäufung der relativ unempfindlichen E_1-P-Form.
Canessa et al. (1973) fanden, daß auch Harmalin die Na^+-abhängige Phosphorylierung kompetitiv gegenüber Na^+ hemmt. Die Hemmung durch Harmalin und BIIA in Gegenwart von Oligomycin zeigt, daß diese Substanzen nicht primär über eine Hemmung des Übergangs E_1-E_2 wirksam werden.
Ferner wurde die Wirkung von BIIA auf die K^+-abhängige Dephosphorylierung, d.h. die Dephosphorylierung des K^+-empfindlichen Mg-Na-E_2-P-Komplexes (vgl. Abb. 23), die ADP-abhängige Dephosphorylierung, d.h. die Dephosphorylierung des ADP-empfindlichen Na-E_1-P-Komplexes (vgl. Abb. 23) und die spontane Dephosphorylierung, d.h. die Stabilität des Phosphoenzyms, untersucht. BIIA hatte auf diese Raktionsschritte keine Wirkung. Dies läßt darauf schließen, daß die Stabilität des Phosphoenzyms sowie die K^+- oder ADP-Empfindlichkeit der individuellen Phosphoenzyme durch BIIA nicht verändert werden.
Angesichts der bisher besprochenen Wirkung von BIIA soll im folgenden der Wirkungsmechanismus der Herzglykoside, soweit er aufgeklärt ist, vergleichend diskutiert werden:

Ein Reaktionsmedium, das ATP, Mg^{++} und Na^{+} enthält und die Bildung des Komplexes Mg-E_2-P bewirkt (vgl. Abb. 23), fördert die ^{3}H-Digoxin-Bindung, die bei 37° C innerhalb 3 min nahezu abgeschlossen ist (Matsui und Schwartz, 1967; 1968). In Übereinstimmung mit der Vorstellung, daß das Herzglykosid an das phosphorylierte Enzym gebunden wird, hemmt K^{+}, das die Menge an phosphoryliertem Enzym senkt, auch die Bindung von Ouabain und Digoxin. Für Herzglykoside und BIIA ist die Anwesenheit von ATP eine gemeinsame Voraussetzung. BIIA hemmt jedoch die ATPase durch Bildung eines stabilen Komplexes, der zwischen E_1 und dem Angriffspunkt der Herzglykoside lokalisiert ist (vgl. Abb. 23). Es kann angenommen werden, daß BIIA sich an einen E_1-ATP-Komplex bindet. ATP dürfte dabei gespalten werden, ohne daß die resultierende energiereiche Phosphatgruppe an das Enzym gebunden wird. Dies erklärt die verminderte Markierung durch ^{32}P-ATP. Es bleibt in weiteren Bindungsstudien abzuklären, ob das resultierende ADP an das gehemmte Enzym gebunden bleibt und ob BIIA die Na^{+},K^{+}-ATPase ähnlich wie K^{+} dephosphoryliert.

Die Ouabain-Bindung wurde auch unter anderen als den oben erwähnten Bedingungen beobachtet, nämlich in Gegenwart von ATP und Mg^{++}; Mg^{++} und anorganischem Phosphat, Arsenat oder Acetat und Mg^{++} oder Mn^{++} alleine (Albers et al., 1963; Matsui und Schwartz, 1968; Schwartz et al., 1968). Diese Bedingungen dürften wohl für die Bildung eines energiereichen Phosphoenzyms weniger förderlich sein. Post et al. (1975) konnten jedoch zeigen, daß in Gegenwart von Mg^{++} und anorganischem Phosphat die Bildung eines kovalent gebundenen Phosphoenzyms auftritt. Verschiedene Studien unterstützen die Hypothese, daß es nur <u>einen</u> durch Liganden induzierten Zustand der Na^{+},K^{+}-ATPase gibt, der die für eine Bindung notwendige Ausrichtung des Rezeptors aufweist (Zusammenfassende Übersicht bei Schwartz et al., 1975). Die verschiedenen Bin-

dungsstärken, die den verschiedenen Ligandenbedingungen entsprechen, mögen verschiedene stationäre Zustände eines besonderen aktiven Enzymzustands wiederspiegeln, der für die Herzglykosidbindung verantwortlich ist.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Hemmechanismus der Na^+,K^+-aktivierbaren ATPase durch BIIA beschrieben und mit dem schon bekannten Hemmechanismus anderer Substanzen, insbesondere dem der Herzglykoside verglichen.

Der Hemmechanismus von BIIA läßt sich folgendermaßen charakterisieren:

1) Eine spezifische Hemmung der Na^+,K^+-ATPase wird durch das basische lipophile BIIA-Molekül verursacht, denn bei Zunahme des pH-Wertes und damit Zunahme der Lipophilie kommt es zu einer Verstärkung der Hemmung durch BIIA.

2) BIIA hemmt die Na^+,K^+-ATPase unkompetitiv gegenüber ATP. Das bedeutet, daß die Bindung von ATP an das Enzym für die Wirkung von BIIA erforderlich ist.

3) BIIA hemmt die Na^+,K^+-ATPase in einem großen Konzentrationsbereich kompetitiv gegenüber Na^+, d.h. BIIA und Na^+ konkurrieren um die Bindungsstelle oder -stellen am ATPase-Molekül. Das basische lipophile BIIA-Molekül hat eine polare Struktur. Diese dürfte für die Konkurrenz um die Na^+-Bindungsstellen von Bedeutung sein. Ferner wird die Na^+-abhängige Phosphorylierung der Na^+,K^+-ATPase kompetitiv gegenüber Na^+ gehemmt. Diese Wirkung wird durch ATP verstärkt. Die Wirkung von BIIA auf diese Teilreaktion ist noch größer als die Wirkung auf die Gesamt-Enzymaktivität. Daher dürfte die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase auf dieser Stufe für die Hemmung der Gesamt-Aktivität verantwortlich sein.

4) Die Wirkung von BIIA wird durch K^+ verstärkt. Diese Zunahme der Affinität des Enzyms für BIIA könnte durch eine allosterische Interaktion bei der K^+ und Na^+-Bindung zustande

kommen. Es ist möglich, daß K^+ mit Na^+ um dieselben Bindungsstellen konkurriert, oder daß eine höhere Konzentration von dephosphoryliertem Enzym E_1 bereitgestellt wird, das ATP und BIIA bindet.

5) Die vollständige Hemmung innerhalb einer Minute, die zu 100 % reversibel ist und die Aktivierungsenergie des Enzyms nicht ändert, spricht dafür, daß die Bindung von BIIA einer sehr schnellen Kinetik folgt, keine irreversiblen Strukturänderungen des Enzyms bewirkt und durch physikalisch-chemische Interaktion verursacht wird.

6) Die Stabilität des Enzym-Phosphat-Komplexes sowie dessen ADP- und K^+-abhängige Dephosphorylierung werden durch BIIA nicht beeinflußt.

Die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch BIIA läßt sich in folgenden Punkten mit der Wirkung der Herzglykoside vergleichen:

1) Sie hängt von der Lipophilie des Moleküls ab.
2) Sie kann 100 % erreichen.
3) Sie wird durch ATP gefördert.

Die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch Herzglykoside unterscheidet sich in folgenden Punkten deutlich von der Hemmung durch BIIA:

1) Die Bindungskinetik ist relativ langsam und vom Ionenmilieu abhängig.

2) Im Gegensatz zu BIIA wird die in Anwesenheit von ATP durch Herzglykoside verursachte Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch Na^+ gefördert und durch K^+ abgeschwächt.

3) Die Na^+-abhängige Phosphorylierung der ATPase wird durch Herzglykoside nur schwach gehemmt. Es wird angenommen, daß die Hemmung der K^+-abhängigen Dephosphorylierung, die bis zur bestimmten Konzentration der Herzglykoside kompetitiv mit K^+ ist, für die Hemmung der Gesamt-Aktivität verantwortlich ist.

Literaturverzeichnis

Akera, T., Larsen, F.S., Brody, T.M.: The effect of ouabain on sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase from the hearts of several mammalian species. J. Pharmacol. Exp. Ther. 170, 17, (1969).

Akera, T.: Quantitative aspects of the interaction between ouabain and the Na^+-K^+-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 245, 53-62 (1971).

Akera, T., Bennett, R.T., Olgaard, M.K., Brody, T.M.: Cardiac Na^+,K^+-ATPase inhibition by ouabain and myocardial Na^+, a computer simulation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 199, 287 (1976).

Albers, R.W., Koval, G.J., Siegel, G.J.: Studies on the interaction of ouabain and other cardioactive steroids with sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. Mol. Pharmacol. 4, 324-336 (1968).

Allen, J.C., Schwartz, A.: Effects of Potassium, Temperature and Time on ouabain interaction with the cardiac Na^+,K^+-ATPase: Further evidence supporting an Allosteric site. J. Mol. Cell. Cardiol. 1, 39-45 (1970).

Armstrong, J., Barlow, R.B.: The ionization of phenolic amines, including apomophine, dopamine and catecholamines and an assessment of zvitterion constants. Br. J. Pharmacol. 57, 501-516 (1976).

Bader, H., Post, R.L., Bond, G.E.: Comparison of sources of phosphorylated intermediate in transport ATPase. Biochim. Biophys. Acta 150, 41-46 (1968).

Bader, H., Wilkes, A.B., Jean, D.H.: The effect of hydroxylamine, mercaptans, divalent metals and chelators on Na^+,K^+-ATPase. A possible control mechanism. Biochim. Biophys. Acta 198, 583-593 (1970).

Barnett, R.E.: Effect of monovalent cations on the ouabain inhibition of the sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase. Biochemistry. 9, 4644-4648 (1970).

Bluschke, V., Bonn, R., Greeff, K.: Increase in the (Na^++K^+)-ATPase activity in heart muscle after chronic treatment with digitoxin or potassium deficient diet. Eur. J. Pharmacol. 37, 189-191 (1976).

Bonting, S.L., Hawkins, N.M., Canady, M.R.: Studies of Sodium-Potassium activated adenosine Triphosphatase VII-Inhibition by erythrophleum alkaloids. Biochem. Pharmacol. 13, 13-22 (1964).

Borsch-Galetke, E., Dransfeld, M., Greeff, K.: Specific activity and sensitivity to strophanthin of the Na^++K^+-activated ATPase in rats and guinea-pigs with hypoadrenalism. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 74-80 (1972).

Boyer, P.D.: Chapter 6, Pyruvate Kinase. The Enzymes 6, 95 (1962)

Bretscher, M.S.: Membrane structure: some general principles. Science 181, 622-629 (1973).

Canessa, M., Jaimovich, E., de la Fuente, M.: Harmaline: A competitve inhibitor of Na^+-ion in the (Na^++K^+)-ATPase system. J. Membr. Biol. 13, 263-282 (1973).

Charnock, J.S.: Activation energy and phospholipid requirement of membrane-bound Adenosine Triphosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 159, 393-399 (1973).

Chaplain, R.A.: The effect of intracellular potassium ions on active sodium efflux in frog sartorius muscle. Experientia. 29, 794 (1973).

Clarke, S.: The size and detergent binding of membrane proteins. J. Biol. Chem. 250, 5459-5469 (1975).

Cuatrecasas, P.: Membrane Receptors. Annu. Rev. Biochem. 43, 169 (1974).

Dahl, J.L., Hokin, L.E.: The Na^+-K^+-ATPase. Annu. Rev. Biochem. 43, 327 (1974).

De Pont, J.J.M.M.M., Van Prooijen-Van Eeden, A., Bonting, S.L.: Studies on (Na^+-K^+)-activated ATPase, XXXIV. Phosphatidylserine not essential for (Na^+-K^+)-ATPase activity. Biochim. Biophys. Acta 323, 487-494 (1973).

Denticke, B.: Passive Transportmechanismen an der Erythrozytenmembran. Arzneim. Forsch. 22, 2043-2049 (1972).

Dixon, M., Webb, E.C.: Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics. Nature 184, 1296 (1959).

Draper, M.H., Weidmann, S.: Cardiac resting and action potentials recorded with an intracellular electrode. J. Physiol. (Lond). 155, 74 (1951).

Dunham, E.T., Glynn, I.M.: Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. J. Physiol. (Lond.) 156, 274-293 (1961).

Erdmann, E., Bolte, H.-D., Lüderitz, B.: The $(Na^+ + K^+)$-ATPase activity of guinea pig heart muscle in potassium deficiency. Arch. Biochem. Biophys. 145, 121 (1971).

Erdmann, E., Schoner, W.: Ouabain-receptor interactions in $(Na^+ + K^+)$-ATPase preparations II. Effect of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants. Biochim. Biophys. Acta 330, 302-315 (1973).

Erdmann, E., Schoner, W.: Ouabain-receptor interactions in $(Na^+ + K^+)$-ATPase preparations IV. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glycoside receptor. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 335 (1974).

Erdmann, E., Krawietz, W., Presek, P.: Receptor for Cardiac Glycosides. "Myocardial Failure", Ed. Rieker , G., Weber, A., Goodwin, J., 120-131 (1977).

Fahn, S., Albers, R.W., KoVal, G.J.: Electrophorus adenosine triphosphatase: sodium-activated exchange after N-ethylmaleimide treatment. Science 145, 283-284 (1964).

Fahn, S., Hurley, M.R., Koral, G.J., Albers, R.W.: Sodium-potassium-activated adenosine triphophatase of Electrophorus electric organ. J. Biol. Chem. 241, 1890-1895 (1966).

Fahn, S., Koval, G.J., Albers, R.W.: Sodium potassium-activated adenosine triphosphatase of electrophorus electric organ. V. Phosphorylation by adenosine triphosphate ^{32}P. J. Biol. Chem. 243, 1993-2002 (1968).

Fiske, C.H., Subbarow, J.: The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375-400 (1925).

Fritz, P.J., Hamrick, M.E.: Enzymatic analysis of adenosine triphosphatase. Enzymol. Acta Biocat. 30, 57 (1966).

Fujita, M., Nakao, T., Tashima, Y., Mizuno, N., Nagano, K., Nakao, M.: Potassium-ion stimulated p-nitro-phenylphosphatase activity accurring in a highly specific adenosine triphosphatase preparation from rabbit brain. Biochim. Biophys. Acta 117, 42-53 (1966).

Gelbart, A., Goldman, R.H.: Correlation between microsomal (Na^+K^+)-ATPase activity and (^3H)Ouabain binding to heart tissue homogenates. Biochim. Biophys. Acta 481, 689-694 (1977).

Glynn, I.M.: The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. J. Physiol.(Lond.) 136, 148-173 (1957).

Glynn, I.M.: Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium. J. Physiol. (Lond.) 160, 18 (1962).

Glynn, I.M.: Membrane ATPase and cation transport. Br. Med. Bull. 24, 165-169 (1968).

Glynn, I.M., Karlish, S.J.D.: The sodium Pump. Annu. Rev. Physiol. 37, 13-55 (1975).

Greeff, K.: Zur Pharmakologie der herzwirksamen Glykoside: Die Wirkung der Glykoside auf den Stoffwechsel des Herzmuskels. Klin. Physiol. 1, 340-370 (1963).

Greeff, K., Bonn, R., Noack, E.: Studies on the mechanism of cardiac glycosides. Rev. Hung. Acad. Sci., 97-104 (1974).

Hafner, D., Heinen, E., Noack, E.: Mathematical analysis of concentration-response relationships. Method for the evaluation of the ED_{50} and the number of binding sites per receptor molecule using the logit transformation. Drug. Research. 27, 1871-1873 (1977).

Hegyvary, C., Post, R.L.: Binding of adenosine triphosphate to sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 246, 5234 (1971).

Hegyvary, C.: Ouabain-binding and phosphorylation of (Na^++K^+) ATPase treated with N-ethylmaleimide or oligomycin. Biochim. Biophys. Acta 422, 365-379 (1976).

Hook, J.B.: A positive correlation between natruiresis and inhibition of renal Na^+K^+-ATPase by ouabain. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 731-734 (1969).

Jackson, R.L., Gotto, A.M.: Phospholipids in biology and medicine. The New Engl. J. of Med. 3, 21-29 (1974).

Jöbsis, F.F., Vreman, H.J.: Inhibition of the Na^+ and K^+-stimulated adenosine triphosphatase by oligomycin. Biochim. Biophys. Acta 73, 343 (1963).

Jørgensen, P.L., Skou, J.C.: Purification and characterization of (Na^++K^+)-ATPase. I. The influence of detergents on the activity of (Na^++K^+)-ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidneys. Biochim. Biophys. Acta 233, 366-380 (1971).

Jørgensen, P.L.: Purification of (Na^++K^+)ATPase: active site determinations and criteria of purity. Biochim. Biophys. Acta 356, 53-67 (1974).

Jørgensen, P.L.: Purification of (Na^++K^+)-ATPase from the outer medulla of mammalian kidneys after selective removal of membrane components by SDS. Biochim. Biophys. Acta 356, 36-52 (1974 a).

Klodos, I., Skou, J.C.: The effect of Mg^{2+} and chelating agents on intermediary steps of the reaction of Na^+,K^+-activated ATPase. Biochim. Biophys. Acta 391, 474-485 (1975).

Kyte, J.: The titration of the cardiac glycoside binding site of the (Na^+,K^+)-adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 247, 7634-7641 (1972).

Kyte, J.: Structural studies of sodium and potassium ion-activated Adenosine Triphosphatase. J. Biol. Chem. 250, 7443-7449 (1975).

Langer, G.A.: Relationship between myocardial contractility and effects of digitalis on ionic exchange. Fed. Proc. 36, 2231-2234 (1977).

Lehninger, A.L.: Biochemistry. Worth 2nd Edn. (1976).

Lineweaver, H., Burk, D.J.: The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934).

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).

Matsui, H., Schwartz, A.: Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the Na^+K^+-dependent ATPase from cardiac tissue. Biochim. Biophys. Acta 151, 655-663 (1968).

McMurray, W.C., Magee, W.L.: Phospholipid Metabolism. Annu. Rev. Biochem. 41, 129-160 (1972).

Nakao, T., Tashima, K., Nagano, K., Nakao, M.: Highly specific sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase from various tissues of rabbit. Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 755 (1965).

Nayler, W.: Ion movement in heart muscle. Membrane and Ion Transport, Chapter 3, Vol. 2 (1970).

Okita, G.H.: Dissociation of Na^+,K^+-ATPase inhibition from digitalis inotropy. Fed. Proc. 36, 2225-2230 (1977).

Op den Kamp, J.A.F.: Structural and Kinetic Approach to plasma Membrane Functions. Lipid organization in Biological Membranes, Chapter 8, Ed.: Nicolan, C., Paraf, A., (1977).

Palatini, P.: Mechanism of inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase by tricyclic antipsychotics. Mol. Pharmacol. 13, 216, (1977 a).

Palatini, P., Dabbeni-Sala, F., Pitotti, A., Bruni, A., Mandersloot, J.C.: Activation of (Na^++K^+)dependent ATPase by lipid vesicles of negative phospholipids. Biochim. Biophys. Acta 466, 1-9 (1977).

Peters, T., Raben, R.H., Wassermann, O.: Evidence for a dissociation between positive inotropic effect and inhibition of the Na^+,K^+-ATPase by ouabain, casseine and their alkylating derivatives. Eur. J. Pharmacol. 26, 166-174 (1974).

Post, R.L., Sen, A.K., Rosenthal, A.S.: A phosphorylated intermediate in the ATP dependent Na^+ and K^+ transport across Kidney membranes. J. Biol. Chem. 240, 1437-1445 (1965).

Post, R.L., Kume, S., Tobin, T., Orcutt, B., Sen, A.K.: Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. J. Gen. Physiol. 54, 306-326 (1969).

Post, R.L., Toda, G., Rogers, R.U.: Phosphorylation by Inorganic Phosphate of Sodium Plus Potassium Ion Transport Adenosine Triphosphatase. J. Biol. Chem. 250, 691-701 (1975)

Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A., Racker, E.: Partial resulution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. 235, 3322 (1960).

Repke, K., Est, M., Portius, M.J.: Über die Ursache der Speciesunterschiede in der Digitalisempfindlichkeit. Biochem. Pharmacol. 14, 1785-1802 (1965).

Robinson, J.D.: Effects of oligomycin on the Na^+,K^+-ATPase. Mol. Pharmacol. 7, 238-246 (1971).

Robinson, J.D.: Cation interaction with different functional states of the Na^+,K^+-ATPase. Ann. N.Y. Acad. Sci. 242, 185 (1974).

Robinson, J.D.: Harmaline inhibits the $(Na^+ + K^+)$dependent ATPase by affecting both Na^+ and K^+ activation. Biochem. Pharmacol. 24, 2005-2007 (1975).

Robinson, J.D.: Na^+ sites of the $(Na^+ + K^+)$-dependent ATPase. Biochim. Biophys. Acta 482, 427-437 (1977).

Roelofsen, B., van Deenen, L.L.M.: Lipid requirement of membrane bound ATPase. Studies on human erythrocyte ghosts. Eur. J. Biochem. 40, 245-257 (1973).

Scatchard, G.: The atraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672 (1949).

Schatzmann, H.J.: The role of Na^+ and K^+ in the ouabain-inhibition of the $Na^+ + K^+$-activated membrane adenosine triphosphatase. Biochim. Biophys. Acta 94, 89-96 (1965)

Schöner, W., von Ilberg, C., Kramer, R., Grubert, W.: On the mechanism of Na^+K^+ stimulated hydrolysis of ATPase. Eur. J. Biochem. 1, 334-343 (1967).

Schoner, W., Beusch, R., Kramer, R.: On the mechanism of Na^+- and K^+-stimulated hydrolysis of adenosine triphosphatase. Eur. J. Biochem. 7, 102-110 (1968).

Schoot, B.M., Schoots, A.F.M., De Pont, J.J.H.H.M., Schuurmans, S.T., Stekhoven, F.M.A.H., Bonting, S.L.: Studies on (Na^++K^+)activated ATPase. XLI. Effects of N-ethylmaleimide on overall and partial reactions. Biochim. Biophys. Acta 483, 181-192 (1977).

Schwartz, A., Matsui, H.: Purification and properties of a highly active ouabain-sensitive Na^+,K^+-dependent adenosine triphosphatase from cardiac tissue. Biochim. Biophys. Acta 128, 380 (1966).

Schwartz, A., Matsui, H., Laughter, A.H.: Tritiated digoxin binding to Na^+,K^+ activated adenosine triphosphatase: possible allostaric site. Science 159, 323-325 (1968).

Schwartz, A., Lindenmayer, G.E., Allen, J.C.: The Sodium-Potassium Adenosine Triphosphatase: Pharmacological, Physiological and Biochemical Aspects. Pharmacol. Rev. 27, 3-134 (1975).

Sen, A.K., Post, R.L.: Stoichiometry and localization of adenosine triphosphatase-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte. J. Biol. Chem. 239, 345-352 (1964).

Sen, A.K., Tobin, T., Post, R.L.: A cycle for ouabain inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 244, 6596-6604 (1969).

Skou, J.C.: The influence of some cations on adenosinetriphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta 23, 394-401 (1957).

Skou, J.C.: Preparation from mammallian brain and kidney enzyme system involved in native transport of Na^+K^+. Biochim. Biophys. Acta 58, 314 (1962).

Skou, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev. 45 596 (1965).

Skou, J.C., Hilberg, C.: The effect of cations, g-Strophanthin and oligomycin on the labeling from(^{32}P)ATP of the (Na^+K^+) activated enzyme system and the effect of cations and g-Strophanthin on labeling from (^{32}P)ITP and ($^{32}P_i$). Biochim. Biophys. Acta 185, 198 (1969).

Skou, J.C., Butler, K.W., Hansen, O.: The effect of magnesium, ATP, P_i and sodium on the inhibition of the Na^+,K^+-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 241, 443-461 (1971).

Skou, J.C.: The relationship of the Na^+,K^+activated enzyme system to transport of Na^+ and K^+ across the cell membrane. J. Bioenerg. 4, 1-30 (1973).

Stahl, W.L., Sattin, A., Mc Ilwain, H.: Structural studies of ribonuclease XXI. The reaction between ribonuclease and a water-soluble carbodiimide.Biochem. J. 99, 404 (1966).

Szekeres, L., Papp, G.J., Udvary, E.: On two new isoquinoline derivatives with marked antiauginal and antiarrhythmic actions. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 284, R 79 (1974).

Tobin, T., Akera, T., Baskin, S.I., Brody, T.M.: Calcium ion and sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase: Its mechanism of inhibition and identification of the E_1-P intermediate. Mol. Pharmacol. 9, 336-349 (1973).

Tobin, T., Akera, T., Han, C.S., Brody, T.M.: Li and Rb interactions with Na^+K^+ATPase: a molecular basis for the pharmacological actions these ions. Mol. Pharmacol. 10, 501 (1974).

Titus, E.O.: Characterization of Pharmacological Receptors. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288, 269-281 (1975).

Trevor, A.J., Cummins, J.T.: Properties of sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatases of rat brain-effect of cyclopropane and other agents modifying enzyme activity. Biochem. Pharmacol. 18, 1157-1167 (1969).

Warshel, A.: The energetics of enzymatic reactions. 6th Int. Biophysics Congress, Symp. 14, 1978.

Webb, J.L.: Enzyme and metabolic inhibitors. Acad. Press N.Y., Vol. 1, 487-512 (1963).

Wheeler, K.P., Walker, A.J., Barker, D.M.: Lipid requirement of the membrane sodium and potassium ion-dependent adenosine triphosphatase system. Biochem. J. 146, 713-722 (1975).

Whittam, R.: The asymmetrical stimulation of a membrane adenosine triphosphatase in relation to active cation transport. Biochem. J. 84, 110 (1962).

Whittam, R., Ager, M.E.: The connection between active cation transport and metabolism in erythrocytes. Biochem. J. 97, 214-227 (1965).

Yoda, A., Hokin, E.: On the reversibility of binding of cardiotonicsteroids to a partially puritied(Na + K)-activated adenosine triphosphatase from beef brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 880 (1970).

Yoda, A., Yoda, S.: Influence of pH on the interaction of cardiotonic steriods with sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphate. Mol. Pharmacol. 14, 624-632 (1978).

Zavecz, J.H., Dutta, S.: The relationship between Na^+,K^+-ATPase Inhibition Cardiac Glycoside-Induced Arrhythmia in Dogs. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297, 91-98 (1977).

Herrn Prof. Dr. K. Greeff danke ich für die Überlassung des Themas und für die Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. U. Borchard gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung und Ratschläge während der Durchführung dieser Arbeit.

Fräulein D. Krämer danke ich für die technische Mitarbeit.

Lebenslauf

Am 26.05.1952 wurde ich als Tochter des Architekten John, Eldon Fox und seiner Ehefrau Gwyneth, geb. Forsdike in Maidenhead, Berkshire, England geboren.

Ich besuchte die "Maidenhead Primary" und"Courthouse Road Secondary"Schule, anschließend wechselte ich in die "Maidenhead High"Schule über, an der ich 1970 die"Advanced Level Certificates"(vergl.Abitur) bestand.

Im Wintersemester 1970 begann ich mein Studium an der Exeter Universität in Devon, England. Mein Hauptfach war Zoologie, das Nebenfach Chemie. Im Juli 1973 beendete ich dieses Studium mit dem Abschluß "Bachelor of Science with Honours".

Anschließend begann ich im September 1973 ein Studium an der Universität in Newcastle-upon-Tyne, und zwar Klinische Biochemie. Dieses Studium wurde im Mai 1975 mit dem "Master of Science" abgeschlossen.

Im November 1975 wurde ich am Pharmakologischen Institut der Universität Düsseldorf als Verwalter der Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten angestellt.

Düsseldorf, im Mai 1979

Hanna M. Fox